ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 18 1969 NUMÉRO 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des sommaires et résumés

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (2), 75-91.

ÉTUDE DES ACCIDENTS DE FABRICATION DES CONSERVES DE CHAMPIGNONS DE COUCHE (*AGARICUS HORTENSIS*) PROVOQUÉS PAR DES BACTÉRIES THERMOPHILES

II. — Prévention des accidents (1)

J. RIVIÈRE, C. DENYS, Y. CASSEGRAIN

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Microbiologie,
Institut national agronomique, 75 - Paris (5e)
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

On a recherché l'origine des spores bactériennes responsables des accidents de fabrication. Ces spores se retrouvent en grand nombre dans le fumier et dans les champignons. Il est possible d'en éliminer la plus grande partie en améliorant la technique du lavage. A partir d'une suspension de spores contenues dans le fumier, on a pu calculer des normes de stérilisation. Au-dessous de pH 5,2 la germination des spores ou la croissance végétative d'un grand nombre de souches responsables des accidents de fabrication sont inhibées. Une expérimentation à l'échelle industrielle d'une nouvelle méthode de lavage paraît donner des résultats intéressants, en diminuant le pourcentage des accidents.

INTRODUCTION

On a mis en évidence (Rivière et Cassegrain, 1968) que les types d'accidents et les souches contaminant les boîtes diffèrent d'une usine à l'autre.

Il est apparu nécessaire de déterminer maintenant l'origine des bactéries sporulées responsables de cette contamination.

Les spores thermorésistantes peuvent être introduites dans la boîte avec la saumure, le jus de cuisson ou les champignons. On peut également penser que l'eau de refroidissement est susceptible de contaminer certaines boîtes au niveau des sertis. Cependant la source la plus importante, sinon la seule, est vraisemblablement constituée par les particules de fumier au contact du pied des champignons.

(1) La première partie de cet article a paru dans le numéro 3/1968 des Annales de Technologie agricole.

C'est pourquoi on a été amené à dénombrer les spores des bactéries thermophiles dans le fumier à divers stades de sa préparation et de son utilisation.

Après avoir localisé la source des contaminations, il a été possible d'envisager la prévention de ces accidents, en essayant, soit de réduire les contaminations au départ, soit de détruire les spores dans les boîtes en déterminant de nouveaux barèmes de stérilisation, soit d'empêcher les spores de germer ou les cellules végétatives de se développer en modifiant les conditions du milieu dans les boîtes.

Dans ce dernier cas un fait intéressant a orienté les recherches. Une des deux usines coopérant à ce travail reçoit des champignons de deux zones de culture bien distinctes :

— la première zone est proche de l'usine, de telle sorte que les champignons après la récolte, sont directement mis en boîtes et stérilisés après addition d'un jus de couverture composé d'eau, de chlorure de sodium et d'acide citrique. Le pH de ce jus est voisin de 6,2 ;

— la deuxième zone, trop éloignée de l'usine pour permettre le transport des champignons frais dans de bonnes conditions, est dotée d'une unité de blanchiment, et le transport s'effectue en fûts, au sein d'un jus additionné d'acide citrique. A l'arrivée dans l'usine, ces champignons sont traités comme ceux de la première zone, mais alors le pH du jus dans les boîtes est plus bas (5,3-5,5).

Des statistiques portant sur plusieurs mois ont montré que la fréquence des accidents de fabrication est beaucoup plus faible dans le cas des boîtes fabriquées à partir des champignons récoltés dans la deuxième zone. Le dosage de l'acide citrique dans le jus des boîtes provenant de ces deux zones a mis en évidence que celles préparées à partie des champignons de la deuxième zone contenaient 54 p. 100 d'acide citrique de plus que les autres. C'est pourquoi on s'est intéressé au pH d'arrêt de la croissance des souches isolées des accidents de fabrication.

Il faut également noter qu'aucune des deux usines n'utilise, à l'heure actuelle, un procédé de lavage vraiment efficace, dans la mesure où les industriels se contentent de brasser les champignons pendant 3 à 4 minutes dans des bacs en ciment, à raison de 400 kg pour 1 000 l d'eau. Il suffit à cet égard de constater le degré de pollution de l'eau et l'importance des dépôts formés au fond des bacs pour s'en convaincre aisément. Cet état de fait a conduit à concevoir un autre système de lavage étudié au laboratoire, puis à l'échelle industrielle.

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

A. — *Recherche et dénombrement des spores bactériennes responsables des accidents de fabrication dans la saumure, le jus de cuisson, l'eau de refroidissement et les fumiers à divers stades de préparation*

1. *Prélèvements.*

Dans les deux usines A et B, on prélève aseptiquement l'eau de lavage des champignons, l'eau de l'usine, la saumure, l'eau de refroidissement des autoclaves ou du stériflamme, et le jus de cuisson.

Pour le fumier, on utilise un cylindre en aluminium (5 cm de diamètre sur 11 cm de hauteur), fermé à un bout, dont l'extrémité ouverte a une bordure tranchante. En enfonçant le cylindre dans la

masse du fumier, on obtient une carotte représentant un prélèvement moyen dans le cas d'une caisse de culture.

A l'arrivée au laboratoire, on pèse 5 g constitués de plusieurs petites portions d'un même échantillon. On les broie dans 100 ml d'une solution tampon pendant 7 minutes (homogénéiseur Biorex). Il s'agit d'un tampon phosphate M/25 à pH 6,2 correspondant au pH moyen des boîtes normales. Ensuite 20 ml du broyat sont introduits dans un tube vide stérile (18 × 180 mm) que l'on scelle, portés 20 mn dans un bain-marie thermostatique à 100°C et refroidis immédiatement. Le même traitement s'applique à tous les échantillons d'eau ou de jus prélevés dans les deux usines.

2. *Milieux.*

a) *Bactéries aérobies et anaérobies facultatives.*

On emploie un milieu mettant en évidence la fermentation du glucose qui caractérise toutes les souches responsables des accidents de fabrication. Après de multiples essais, le milieu suivant a donné satisfaction. Il contient pour 1 litre d'eau distillée :

$NH_4H_2PO_4$	1 g
KCl	0,2 —
$MgSO_4, 7H_2O$	0,2 —
Extrait de levure (Difco)	1 —
Bacto-tryptone (Difco)	2 —
Gélose noble (Difco)	15 —
Solution de pourpre de bromocrésol à 0,4 p. 100	10 ml
Amidon soluble	0,2 g

Au moment de l'emploi on ajoute 5 g par litre de glucose en solution stérilisée par filtration. Ce milieu est ajusté à pH 7,2.

b) *Bactéries anaérobies strictes.*

Tous les essais utilisant des substances inhibitrices, tels que des colorants, l'acide sorbique, l'acide propionique ou le phényléthylalcool à 0,1 p. 100, n'ont pas donné satisfaction. Par contre, il est possible de mettre facilement en évidence les spores des bactéries anaérobies strictes produisant de l'hydrogène sulfuré en utilisant le milieu suivant qui contient par litre d'eau distillée et est ajusté à pH 7,2 :

Bacto-tryptone (Difco)	5 g
Protéose-peptone n° 3 (Difco)	5 —
Extrait de viande (Difco)	2 —
Extrait de levure (Difco)	5 —
Glucose	2 —
Amidon soluble	5 —
NaCl	5 —
Chlorhydrate de cystéine	0,4 —
Gélose noble (Difco)	8 —

On le repartit à raison de 20 ml par tube de 18 × 250 mm.

Au moment de l'emploi, le milieu ayant été régénéré (20 mn dans un bain-marie bouillant) et ramené à 60°C, on ajoute quelques gouttes d'une solution d'alun de fer ammoniacal à 5 p. 100 et 0,5 p. 1 000 de sulfite de sodium stérilisés à part (Mossel et De Waart, 1968).

3. *Dénombrement des spores.*

a) *Bactéries aérobies et anaérobies facultatives.*

On utilise la méthode de la double couche en préparant des plaques de gélose contenant 15 ml du milieu que l'on laisse sécher 24 heures à l'étuve à 30°. On verse alors à la surface de chaque plaque 1 ml de chaque dilution mélangé dans un tube contenant 4 ml du même milieu (gélosé à 8 g par litre) fondu et ramené à 50°. On utilise deux plaques par dilution. Après incubation à 55° pendant 10 jours, on dénombre tous les jours les colonies entourées d'un halo jaune tant que c'est possible. En effet, les colonies bactériennes qui ne fermentent pas le glucose alcalinisent plus ou moins rapidement le milieu, rendant toute observation impossible.

b) *Bactéries anaérobies strictes.*

Le dénombrement se fait après avoir ensemencé en double exemplaire 1 ml de chaque dilution

dans le milieu au sulfite. On incube à 55° et l'on compte les colonies noires apparues tous les jours pendant 10 jours.

4. *Isolement, purification et identification des souches.*

On utilise les techniques déjà décrites (RIVIÈRE et CASSEGRAIN, 1968).

B. — *Détermination de l'efficacité du lavage*

1. *Prélèvements.*

Les champignons frais provenant des caves approvisionnant les deux usines sont traités, soit directement en vue de dénombrer les spores thermophiles et thermorésistantes, soit après lavage. Le traitement qu'ils subissent est voisin de celui du fumier. On pèse 50 g de champignons qui sont ensuite broyés dans 450 ml d'eau et portés 20 mn dans un bain-marie à 100°C avant de faire les dénombrements.

2. *Lavages.*

Des essais ont été réalisés à l'échelle du laboratoire à l'aide de modèles simples essayant de reproduire le plus exactement possible les conditions du lavage à l'usine.

a) *Lavage par brassage.*

Le modèle utilisé est constitué d'un cristallisoir en Pyrex de 16,5 cm de diamètre sur 8,5 cm de hauteur, d'une contenance de 1 700 ml, dans lequel on introduit :

— 1 litre d'eau ;
— 0,25 g de métabisulfite de sodium ;
— 100 g de champignons frais que l'on immerge complètement en les recouvrant d'une surface grillagée convenablement découpée.

On brasse le mélange avec un agitateur magnétique réglé de manière à satisfaire aux conditions de vitesse et de temps de brassage réalisées dans les deux usines.

On retire ensuite ce premier lot de champignons pour remettre à l'immersion un nouveau lot de 100 g jusqu'à ce que 400 g aient été lavés dans le même litre d'eau initiale. L'analyse bactériologique porte sur le dernier lot afin de se trouver dans les conditions les plus défavorables, compte tenu d'une contamination possible au contact d'une eau déjà polluée. On réalise le parage, soit avant le brassage, soit après.

b) *Lavage par aspersion et brassage.*

Un lot de 100 g de champignons est arrosé avec une pissette contenant 500 ml d'eau distillée et 0,125 g de métabisulfite de sodium. Pour ce, on verse une première fois 250 ml d'eau en agitant bien les champignons, afin que l'aspersion porte sur toute leur surface. On brasse ensuite selon la technique déjà décrite dans 750 ml d'eau, et l'on arrose à la fin avec le restant du contenu de la pissette.

On réalise également le parage, soit au début, soit à la fin du lavage.

3. *Dénombrement des spores.*

On utilise la technique décrite lors de l'étude concernant le fumier.

C. — *Détermination des courbes de durées thermiques mortelles des spores thermophiles et thermorésistantes du fumier*

1. *Préparation des suspensions de spores.*

On broie 15 g de fumier dans 210 ml de tampon phosphate M/25 à pH 7,0. Le broyat en suspension est chauffé 3 mn à 100°C. Après refroidissement, on fait agir du lysozyme à raison de 100 µg par ml de suspension et l'on incube à 30° pendant 2 heures (KIM et NAYLOR, 1966).

2. *Dénombrement des spores.*

Les spores sont dénombrées après dilutions et ensemencements dans les deux milieux gélosés déjà cités.

3. *Détermination de la résistance à la chaleur.*

On utilise la méthode décrite par CHEFTEL et THOMAS (1963). On prépare des tubes fins (avec de la canne de verre Pyrex de 9 mm de diamètre extérieur et 1 mm d'épaisseur) de 12 cm de hauteur. On les remplit, soit avec 2 ml du milieu liquide modifié pour bactéries aérobies, soit avec 5 ml du milieu gélosé pour bactéries anaérobies, et d'une suspension de spores, de telle sorte qu'il y en ait au moins 10^4 par tube. Les tubes remplis sont scellés à la flamme à environ 5 cm au dessus du niveau du contenu (bactéries aérobies) ou au niveau du contenu (bactéries anaérobies). On les plonge ensuite dans un bain d'éthylène glycol muni d'un régulateur de température, et on les maintient à une température donnée pendant des durées de chauffage déterminées. Dès que le temps de chauffage est écoulé, les tubes sont sortis du bain et plongés dans l'eau froide. Les durées de chauffage doivent croître selon une série géométrique à partir de 1 mn, avec une raison de 1,2. Lorsque le refroidissement est terminé, les tubes sont placés directement à l'étuve à 55° pendant 40 jours.

On note alors les résultats positifs ou négatifs en examinant la croissance si elle a lieu. On peut ainsi établir les courbes de durée thermique mortelle (T. D. T.) des spores. Pour ce, on porte les températures en abscisses et les logarithmes des durées de chauffage en ordonnées (ou les durées elles-mêmes lorsqu'on utilise du papier semi-logarithmique). A partir des courbes, on peut alors déterminer F et Z. Bien entendu, il ne s'agit pas de souches pures, mais d'un mélange hétérogène de spores contenues dans le fumier.

Le milieu liquide modifié pour les bactéries aérobies et anaérobies facultatives à la composition suivante, pour 1 litre d'eau distillée :

$NH_4H_2PO_4$	1 g
KCl	0,2 —
$MgSO_4$, 7 H_2O	0,2 —
Extrait de levure (Difco)	0,5 —
Bacto-tryptone (Difco)	1 —
Amidon soluble	0,2 —
Solution de pourpre de bromocrésol à 0,4 p. 100	10 ml

On ajuste à pH 7,2. Après stérilisation à l'autoclave, au moment de l'emploi, on ajoute 5 g par litre de glucose en solution stérilisée par filtration.

D. — *Détermination du pH d'arrêt de la croissance des diverses souches isolées*

1. *Milieux.*

a) *Bactéries aérobies et anaérobies facultatives.*

On utilise le même milieu minéral complémenté, sans gélose, et un milieu organique dont la composition est la suivante, pour 1 litre d'eau distillée :

Bacto-tryptone (Difco)	3 g
Extrait de levure (Difco)	2 —
Extrait de viande (Difco)	3 —
Glucose	2 —

b) *Bactéries anaérobies strictes.*

On utilise le milieu déjà décrit mais sans gélose. Dans tous les cas, on réalise une échelle de pH de la manière suivante : après 20 mn de stérilisation à 115°, on ajoute aseptiquement une solution de divers acides (citrique, acétique, chlorhydrique) à 2 p. 1 000 stérilisée par filtration afin d'obtenir une gamme de pH s'étendant de 5,00 à 6,20.

2. *Conditions d'expérimentation.*

Après ensemencement et 10 jours d'incubation à 55°, la croissance a été mesurée par turbidimétrie pour caractériser le pH d'arrêt de la croissance de ces diverses souches.

E. — *Influence de l'action du lavage sur les accidents de fabrication à l'échelle industrielle*

Conditions d'expérimentation.

On a préparé des boîtes témoins dont les champignons ont subi le lavage traditionnel. Aussitôt

après, on prépare des boîtes-essais avec des champignons ayant subi un autre système de lavage dont on a jugé l'efficacité au laboratoire.

Le procédé extrêmement simple groupe les trois opérations suivantes, dans l'ordre indiqué : aspersion, brassage et aspersion.

Pour ce faire, on commence par laver abondamment les champignons en les aspergeant avec un jet d'eau à moyenne pression. On les plonge ensuite dans un bac métallique rempli d'eau et de métabisulfite de sodium (0,25 g par litre) et l'on brasse le tout en essayant de maintenir les champignons immergés. On retire alors ces derniers pour les laver à nouveau par aspersion. On les pare enfin avec des gants et des couteaux propres sur des tables javelisées avant de les blanchir et de les emboîter selon la méthode classique, puis de les stériliser.

On a préparé 400 boîtes, de dimensions 97 × 54 mm, mises à incuber à 55° pendant 10 jours afin de comparer le taux de contamination dans les deux cas.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. — *Recherche et dénombrement des spores bactériennes responsables des accidents de fabrication*

On ne retrouve des spores thermophiles que dans l'eau de lavage des champignons et dans le jus de cuisson. Il apparaît donc nettement que les contaminations sont apportées par les champignons toujours souillés avec un peu de fumier, d'où la nécessité de dénombrer les spores responsables des accidents aux différents stades de la préparation du fumier.

Les résultats résumés dans le tableau 1 mettent en évidence que le fumier de l'usine B est toujours, après pasteurisation, plus riche en spores de bactéries thermo-

TABLEAU 1

Dénombrement dans le fumier frais des spores de bactéries thermophiles aérobies ou anaérobies facultatives fermentant le glucose

(en milliers par g de fumier)

Stade de fabrication des échantillons analysés					
Usine A			Usine B		
Date du prélèvement	Avant pasteurisation	Après pasteurisation	Date du prélèvement	Avant pasteurisation	Après pasteurisation
6-11-67	10 000	12 000	19-10-67	40 000	20 000
6-11-67	12 000	14 000	19-10-67	40 000	20 000
18-12-67	800	2 200	14-12-67	20 000	4 000
2- 1-68	2 500	4 800	28-12-67	20 000	8 000
15- 1-68	200	600	13- 1-68	—	1 200
5- 2-68	8 000	200	27- 1-68	4 000	800
26- 2-68	3 400	600	10- 2-68	46 000	8 000

TABLEAU 2

Dénombrement dans le fumier frais des spores de bactéries thermophiles anaérobies réduisant les sulfites
(en milliers par g de fumier)

Stade de fabrication des échantillons analysés					
Usine A			Usine B		
Date du prélèvement	Avant pasteurisation	Après pasteurisation	Date du prélèvement	Avant pasteurisation	Après pasteurisation
23-10-67	14	376	19-10-67	82	62
6-11-67	—	160	19-10-67	68	40
6-11-67	2	154	19-10-67	110	38
20-11-67	2	60	16-11-67	44	24
18-12-67	2	252	14-12-67	36	4
2- 1-68	2,7	425	28-12-67	4	8,7
15- 1-68	16,5	186	13- 1-68	—	66,4
5- 2-68	18	194	27- 1-68	2	20
26- 2-68	240	1 400	10- 2-68	14	10

TABLEAU 3

Dénombrement des spores de bactéries thermophiles dans les échantillons de fumier en fin de culture
(en milliers par g de fumier frais)

Aérobies Anaérobies facultatives		Anaérobies strictes	
Usine A	Usine B	Usine A	Usine B
20	400	6	32
200	—	56	20
40	40	77	2
20	60	169	2
20	20	2	3
20	100	1	26
400	140	1	52

TABLEAU 4

Dénombrement des spores de bactéries thermophiles aérobies et anaérobies facultatives acidifiantes sur des champignons frais ayant subi différents traitements

Échantillons	Usine	Résultats en nombre de spores par g de champignons ou par ml d'eau Les nombres entre parenthèses représentent le nombre de spores par g de champignons lavés							
Champignon paré	A	1 700	160	90	10	100	200	200	120
	B	50	30	50	1 200	100	40	—	—
Pied du champignon	A	5 000	7 500	700	2 000	1 000	1 400	6 500	3 200
	B	3 000	1 000	6 000	4 000	3 400	2 700	—	—
Champignon entier lavé par brassage puis paré	A	70	100	60	20	170	90	150	70
	B	120	350	70	370	200	100	—	—
Champignon paré puis lavé par brassage	A	150	30	90	30	270	100	100	60
	B	40	200	80	300	220	40	—	—
Eau de lavage du champignon paré	A	(3) 10	(9) 30	(10) 40	(3) 10	(30) 120	(5) 20	(40) 160	(25) 100
	B	(15) 60	(9) 30	(5) 20	(25) 100	(9) 30	(12) 50	—	—
Eau de lavage du champignon entier	A	(5) 20	(70) 280	(15) 60	(37) 150	(12) 50	(7) 30	(60) 240	(35) 140
	B	(12) 50	(5) 20	(12) 50	(7) 30	(20) 80	(10) 40	—	—

TABLEAU 5

Dénombrement des spores de bactéries thermophiles anaérobies productrices d'hydrogène sulfuré sur des champignons frais ayant subi différents traitements

	Résultats en nombre de spores par g de champignons ou ml d'eau												
	Usine A								Usine B				
Champignon paré	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pied du champignon	0	100	0	130	80	0	150	110	0	0	0	0	0
Champignon entier lavé par brassage puis paré	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Champignon paré puis lavé par brassage	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Champignon paré lavé par aspersion et brassage	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Champignon entier lavé par aspersion et brassage puis paré	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eau de lavage du champignon paré	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eau de lavage du champignon entier	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABLEAU 6

Dénombrement des spores de bactéries thermophiles aérobies et anaérobies facultatives acidifiantes sur des champignons frais ayant subi différents traitements

	Échantillons	Résultats en nombre de spores par g de champignons									
Usine A	Champignon entier lavé par brassage puis paré	200	100	200	200	300	200	100	200	100	200
	Champignon paré lavé par aspersion et brassage	60	30	30	40	50	40	20	60	30	40
	Champignon entier lavé par aspersion et brassage puis paré	10	10	30	20	20	20	0	40	0	10
Usine B	Champignon entier lavé par brassage puis paré	310	200	200	200	300	200	80	90	100	
	Champignon paré lavé par aspersion et brassage	140	150	100	80	100	130	30	10	50	
	Champignon entier lavé par aspersion et brassage puis paré	50	40	30	30	20	20	0	5	10	

philes aérobies et anaérobies facultatives fermentant le glucose que le fumier de l'usine A. La pasteurisation semble avoir peu d'effet sur le fumier de l'usine A, tandis qu'elle réduit le nombre de ces spores dans le cas de l'usine B. On peut noter que le nombre de ces spores est toujours élevé. A la lecture du tableau 2, on remarque qu'il y a plus de spores de bactéries anaérobies strictes produisant de l'hydrogène sulfuré dans le fumier de l'usine A après pasteurisation. Ces faits sont à rapprocher des conclusions de la première partie de cette étude, qui avaient fait apparaître que tous les accidents provoqués par un dégagement d'hydrogène sulfuré se manifestaient uniquement dans l'usine A. Dans ce cas, la pasteurisation du fumier aboutit toujours à augmenter considérablement le nombre de ces spores dans le fumier. En fin de culture (tabl. 3), il apparaît que le nombre des spores est toujours moins élevé, ce qui explique peut-être le fait que les accidents de fabrication ne soient pas toujours constants et qu'il y ait des variations saisonnières au cours des fabrications suivant le stade de la culture des champignons.

B. — *Détermination de l'efficacité du lavage*

Les résultats de toutes les analyses sont résumés dans les tableaux 4, 5 et 6.

On se rend compte que le plus grand nombre de spores se trouve dans le pied (tabl. 4). Dans le cas des bactéries anaérobies productrices d'hydrogène sulfuré, on ne les retrouve que dans le pied des champignons provenant de l'usine A (deux fois seulement dans la partie parée, voir tabl. 5). C'est donc bien le pied qui est le plus fortement contaminé, et c'est pourquoi on pouvait penser apporter une amélioration sensible en parant les champigons avant de les laver. Cependant dans les champignons entiers lavés par brassage, puis parés selon la technique habituelle, et dans les champignons parés, puis lavés par brassage, les résultats des analyses effectuées avec des champignons en provenance des deux usines ne montrent pas de différences significatives (tabl. 4 et 5).

On note également que l'eau de lavage du champignon entier n'est pas notablement plus polluée que celle du champignon paré (tabl. 4). D'où la nécessité de réaliser un autre mode de lavage combinant l'aspersion et le brassage (tabl. 6).

Ce type de lavage, réalisé en modèle au laboratoire, donne des résultats bien supérieurs à la technique classique. Il faut souligner qu'il demande des quantités d'eau plus importantes que celles qui sont utilisées à l'heure actuelle (environ cinq fois plus). Cependant, le fait de parer d'abord le champignon semble augmenter les risques de contamination (tabl. 6). En effet, une fois paré, ce dernier présente une partie poreuse, idéale pour multiplier les risques de contamination au contact d'une eau de lavage polluée par les spores.

Pour vérifier cette hypothèse, on a comparé les résultats de ce type de lavage par aspersion et brassage avec des champignons parés au début ou à la fin. Les résultats résumés dans le tableau 6 sont significatifs.

Quand on lave des champignons entiers par aspersion, puis brassage, et qu'on les pare à la fin, le nombre moyen des spores des bactéries thermophiles responsables du plus grand nombre d'accidents de fabrication est considérablement diminué par rapport aux résultats d'un lavage classique. Cette diminution est de l'ordre de 90 p. 100, soit environ une puissance de 10, ce qui correspond à la valeur D qui caractérise un temps de chauffage à une température donnée.

C. — *Détermination des courbes de durées thermiques mortelles des spores thermophiles et thermorésistantes du fumier*

Dans la figure 1, on a reproduit le diagramme de survie et de destruction des spores thermophiles et thermorésistantes du fumier en représentation semi-logarithmique (en ordonnée les durées de chauffage en minutes, en abscisse les températures de chauffage en degrés centigrades). Il s'agit de droites définies par trois points correspondant à des températures de 115°C, 121,1°C et 130°C.

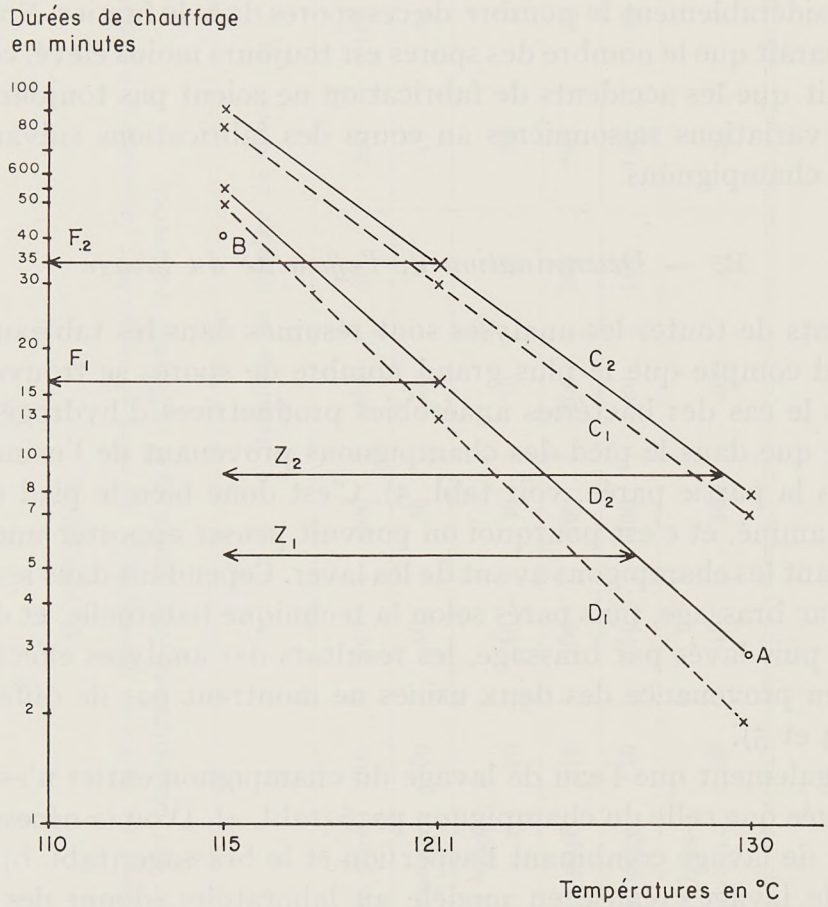


FIG. 1. — *Diagramme de survie et de destruction des spores thermophiles du fumier*

C_1 — survie des bactéries anaérobies strictes
C_2 — destruction des bactéries anaérobies strictes
D_1 — survie des bactéries aérobies et anaérobies facultatives fermentant le glucose
D_2 — destruction des bactéries aérobies et anaérobies facultatives fermentant le glucose
A — barème de stérilisation de l'usine A
B — barème de stérilisation de l'usine B

On note que la courbe de destruction des spores de bactéries, aérobies et anaérobies facultatives acidifiant le glucose, est caractérisée par les valeurs $Z_1 = 11{,}5$, $F_1 = 16$, alors que la courbe de destruction des spores de bactéries anaérobies strictes (se développant dans le milieu choisi) est caractérisé par les valeurs $Z_2 = 14{,}4$, $F_2 = 35$.

Ces résultats appellent plusieurs remarques :

1° les valeurs de Z obtenues dans les deux courbes sont bien caractéristiques de souches thermophiles ;

2° les résultats ne sont valables que pour les concentrations de spores qui ont fait l'objet de l'expérience, soit 6×10^5 spores (par tube) de bactéries aérobies et

anaérobies facultatives acidifiant le glucose, et 10^6 spores de bactéries anaérobies strictes produisant de l'H_2S ou n'en produisant pas.

Compte tenu de ces résultats, étant donné que l'on connaît en moyenne le taux de contamination des spores des bactéries acidifiantes aérobies ou anaérobies facultatives par g de champignons (toujours inférieur à 1 000 par g), on peut déterminer les normes de stérilisation à appliquer (Cheftel et Thomas, 1963).

Soit n le nombre de spores de bactéries aérobies et anaérobies facultatives acidifiant le glucose ; la valeur D, temps de chauffage assurant une réduction décimale du nombre de ces spores, est donnée par la formule suivante :

$$D = \frac{F_1}{\log n} = \frac{16}{5{,}78} = 2{,}72$$

En effet, dans une boîte 4/4 il y a 470 g de champignons, soit au maximum un nombre a de spores $= 1\,000 \times 470 = 4{,}7 \times 10^5$. Le chauffage doit être tel qu'il ne survive plus qu'une spore pour 100 boîtes, soit un nombre de spores $b = 0{,}01$ par boîte. On peut alors calculer F qui représente la durée du chauffage à appliquer :

$$F = D_1 (\log a - \log b) = 2{,}72 (\log 4{,}7 \times 10^5 - \log 0{,}01) = 20{,}8$$

Les conserveurs doivent donc, si c'est possible, revoir leurs barèmes de stérilisation afin de les rendre plus efficaces, les températures et les temps de chauffage utilisés actuellement étant insuffisants.

L'analyse des courbes amène enfin à une dernière remarque. On se souvient que l'étude des accidents de fabrication dans les boîtes de conserve avait montré que l'usine B était surtout le siège d'accidents avec formation d'hydrogène sulfuré et l'usine A de *flat sour*.

On peut désormais avancer une nouvelle hypothèse pour expliquer ce phénomène. L'usine A met en œuvre un traitement thermique suffisant d'après les courbes établies, pour détruire les spores des bactéries aérobies et anaérobies facultatives acidifiant le glucose et donc susceptibles de provoquer des accidents du type *flat sour*.

En ce qui concerne l'usine B, les deux types de spores survivent et l'on peut se demander si le développement des unes (acidifiantes) n'inhibe pas le développement des autres (anaérobies strictes productrices d'H_2S).

D. — *Détermination du pH d'arrêt de la croissance des diverses souches étudiées*

Il faut tenir compte, en premier lieu, des caractères respiratoires des souches isolées.

1. *Cas des souches aérobies et anaérobies facultatives.*

Elles sporulent relativement facilement, ce qui a permis d'effectuer l'expérimentation sur un nombre important de souches isolées et purifiées (33 souches).

Les résultats rassemblés dans le tableau 7 démontrent que la proportion des souches dont la croissance n'est pas arrêtée à un pH inférieur à 5,20 est faible. Elle varie en fonction du milieu et suivant la nature de l'acide. Dans le milieu organique, dont la composition paraît être plus proche de la réalité industrielle que le milieu minéral complémenté, acidifié à l'aide d'acide citrique, la majorité des souches étudiées ont leur croissance bloquée au-dessous de pH 5,40.

TABLEAU 7

Pourcentage des souches aérobies et anaérobies facultatives dont la croissance est possible
(en fonction du pH et de la nature de l'acide ajouté au milieu de culture)

Nature de l'acide	Nature du milieu	pH du milieu				
		⩽ 5,19	5,20 à 5,39	5,40 à 5,69	5,70 à 5,99	> 6,00
Citrique	Minéral complémenté	10,0	16,7	36,7	100,0	100,0
	Organique	0	0	11,1	61,1	100,0
Acétique		0	0	33,3	53,3	100,0
Chlorhydrique		0	3,0	33,3	100,0	100,0

2. *Cas des souches anaérobies strictes.*

L'expérience a été faite avec 23 souches. Les résultats rassemblés dans le tableau 8 sont, dans une très large mesure, comparables aux premiers, ce qui permet

TABLEAU 8

Pourcentage des souches anaérobies strictes dont la croissance est possible
(en fonction du pH)

Nature de l'acide	pH du milieu				
	⩽ 5,19	5,20 à 5,39	5,40 à 5,69	5,70 à 5,99	> 6,00
Citrique	8,7	8,7	73,9	82,6	100,00

de justifier l'hypothèse faite au départ concernant le rôle du pH dans la limitation des accidents.

E. — *Influence de l'action du lavage sur les accidents de fabrication à l'échelle industrielle*

Les résultats sont résumés dans le tableau 9. On peut tirer des conclusions valables du premier essai réalisé dans l'usine B, en constatant une diminution du pourcentage des boîtes contaminées qui passe de 34 p. 100 (témoin avec lavage traditionnel) à 10 p. 100 (essai avec lavage par aspersion et brassage). Dans le cas de l'usine A et d'une deuxième expérience faite également avec 200 boîtes, on n'a pratiquement pas constaté d'accident ou dans les boîtes témoins ou dans les boîtes-essais.

Ce qui démontre la difficulté de réaliser une telle étude, compte tenu du fait des grandes variations saisonnières observées dans la répartition annuelle des accidents de fabrication.

En conclusion, les spores des bactéries thermophiles responsables des accidents de fabrication se retrouvent dans le fumier. Il semble que la préparation du fumier, en multipliant un type de spore déterminé, puisse favoriser un type d'accident donné (tel le dégagement d'H_2S dans le cas des boîtes de l'usine A). Pour limiter ces acci-

TABLEAU 9

Influence du mode de lavage sur les accidents de fabrication des boîtes de champignons après 10 jours d'incubation à 55°

État des boîtes après l'ouverture		Usine A				Usine B			
		Témoin		Essai		Témoin		Essai	
		Nbre de boîtes	(%)	Nbre de boîtes	(%)	Nbre de boîtes	(%)	Nbre de boîtes	(%)
N		49	98	50	100	33	66	45	90
D	+ S	1	2	0	0	6	12	0	0
	— S	0	0	0	0	11	22	5	10
H_2S^+		0	0	0	0	0	0	0	0
Total		50	100	50	100	50	100	50	100
Acidité	pH < 5,8	50	100	7	14	28	56	6	12
	pH ⩾ 5,8	0	0	43	86	22	44	44	88
Total		50	100	50	100	50	100	50	100

Témoin : lavage par brassage.
Essai : lavage par aspersion et brassage.
N : jus clair, sans microorganismes.
D + S : jus trouble, avec une odeur sure caractéristique avec de nombreux microorganismes.
D — S : jus trouble, sans odeur avec de nombreux microorganismes.
H^2S^+ : odeur d'hydrogène sulfuré.

dents, il est recommandé d'augmenter, dans la mesure du possible, les normes de stérilisation compatibles avec les qualités organoleptiques du produit, et surtout d'améliorer le lavage des champignons. Dans ce dernier cas, un essai d'expérimentation à l'échelle industrielle a donné des résultats satisfaisants.

Reçu pour publication en avril 1969.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué avec l'aide financière du Centre technique des Conserves de Produits agricoles, sur des crédits qui ont été accordés à ce dernier par l'interprofession *Champignons de Paris*. Nous remercions également les industriels dont la collaboration bénévole et suivie a permis la réalisation de l'expérimentation.

SUMMARY

STUDY OF MANUFACTURING FAILURES IN TINS OF CULTIVATED MUSHROOMS (AGARICUS HORTENSIS) DUE TO THERMOPHILE BACTERIA

II. — PREVENTION OF FAILURES

The spores responsible for manufacturing failures in the canning industry of cultivated mushrooms can be found again in mushrooms and in manure. At the end of cultivation the number of spores in the manure is much lower, which might account for the fact that the percentage failure offers great variations. It is possible to improve the efficiency of washing in order to remove a greater number of spores by combining aspersion and stirring. An improvement of about 90 p. 100 can be obtained. Starting from a suspension of heterogeneous spores contained in the manure, it has been possible calculate the sterilization norms. Below pH 5,2 the germination of spores or the vegetative growth of a great number of responsible for manufacturing failures are inhibited. An experimentation, on the industrial scale, of a new washing method seems to give interesting results by reducing the percentage of failures.

RESUMEN

ESTUDIO DE LOS ACCIDENTES ACAECIDOS EN LA FABRICACIÓN DE LAS CONSERVAS DE LAS SETAS DE CULTIVO (AGARICUS HORTENSIS) PROVOCADOS POR LAS BACTERIAS TERMOFILAS

II. — PREVISION DE LOS ACCIDENTES

Les esporos responsables de los accidentes de fabricación en las fábricas de conservas de setas de cultivo, se encuentran en las propias setas y en la capa de mantillo en que se cultivan. En fin de cultivo, el número de esporos en el mantillo es mucho menos elevado, lo cual explica posiblemente el hecho de que el porcentaje de accidentes presente grandes variaciones. Existe la posibilidad de mejorar la eficacia del lavado con miras a eliminar un mayor número de esporos combinando la aspersión y la agitación y, de este modo, se llega a obtener una mejora del orden de un 90 p. 100. A partir de una suspensión de esporos heterogéneos contenidos en el mantillo, se han podido calcular las normas de esterilización. Por debajo de un pH 5,2 la germinación de los esporos o el crecimiento vegetativo de un gran número de estirpes responsables de los accidentes de fabricación quedan inhibidos. Una experimentación a escala industial de un nuevo método de lavado parece dar resultados interesantes, al disminuir el porcentaje de accidentes.

RIASSUNTO

STUDIO DEGLI ACCIDENTI DI FABBRICAZIONE DELLE CONSERVE DI FUNGHI DI STRATO (AGARICUS HORTENSIS) PROVOCATI DA BATTERI TERMOFILI

II. — PREVENZIONE DEGLI ACCIDENTI

Le spore responsabili degli accidenti di fabbricazione nelle conserverie dei funghi di strati si ritrovano nei funghi e nel letame. In fine di coltura il numero delle spore nel letame é molto meno elevato, cio che spiega forse il fatto che la percentuale degli accidenti presenta delle grandi

variazioni. E possibile migliorare l'efficacia del lavaggio in vista di eliminare un piú grande numero di spore combinando l'aspersione rimescolio e macerazione. Si riesce ad ottenere un miglioramento dell' ordine di 90 p. cento. A partire da una sospensione di spore eterogenee contenute del letame, si sono potute calcolare delle norme di sterilizzazione ? Al disotto di pH 5,2 la germinazione delle spore o la crescenza vegetativa d'un gran numero di strati responsabili accidenti di fabbricazione sono inibiti Una sperimentazione alla scala industriale d'un nuovo metodo di lavaggio sembra dare dei risultati interessanti diminuendo la percentuale degli accidenti.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CHEFTEL H., THOMAS G., 1963. Principes et méthodes pour l'établissement des barêmes de stérilisation des conserves alimentaires. *Bull. nº* 14. *Établ. J-J. Carnaud et Forges de Basse-Indre.* Gauthier-Villars éd. Paris.

KIM J., NAYLOR H. B., 1966. Spore production by *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Microbiol.*, **14**, 690.

MOSSEL D. A. A., DE WAART J., 1968. The enumeration of *Clostridia* in foods and feeds. *Ann. Inst. Pasteur*, (Lille), **19**, 13.

RIVIÈRE J., CASSEGRAIN Y., 1968. Étude des accidents de fabrication des conserves de champignons de couche provoqués par des bactéries thermophiles. I. Recherche des souches responsables. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 175.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (2), 93-109.

EXTRACTION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DU RAISIN

I. — Technique d'estimation d'une vendange

S. AUBERT, C. POUX

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Les conditions de diffusion et de conservation des composés polyphénoliques du raisin, matières colorantes anthocyaniques et tannoïdes totales, sont étudiées dans différents milieux de composition « modèle » du vin.

Une technique d'extraction et d'évaluation de ces constituants, sur les diverses parties du raisin, est proposée en vue de déterminer les teneurs potentielles de vendanges différentes.

La variabilité entre divers lots de baies est analysée en fonction des facteurs origine et maturité du raisin, sur un même cépage : le *Carignan noir*.

INTRODUCTION

La couleur d'un vin et d'autres caractères organoleptiques, comme la saveur, le corps, l'amertume, ainsi que certaines propriétés physiologiques, comme les facteurs vitaminiques P, donnent aux composés polyphénoliques une importance particulière parmi les constituants des produits de la vigne.

La teneur d'un vin en matières colorantes ou en composés du type tanin est, en première analyse, donnée comme fonction de la richesse initiale du raisin en composés phénoliques et ensuite du mode de vinification.

Dans ce premier mémoire, nous nous sommes penchés sur l'étude de la matière première et sur les phénomènes de diffusion des composés polyphénoliques dans des milieux de composition voisine du vin.

L'extraction totale des polyphénols des différentes parties du raisin est un objectif difficile à atteindre, mais indispensable s'il s'agit d'établir un bilan aussi complet que possible des transpositions, ou taux de passage, dans le vin des anthocyanes et tanins d'une vendange donnée.

Les manuels classiques d'Œnologie rapportent quelques données générales sur le raisin. La composition pondérale de la vendange de *Carignan*, rapportée par VENTRE (1931) est : rafle 3 p. 100, pellicules 7,4 p. 100, pépins 2,9 p. 100, soit 13,30 kg de parties solides pour 100 kg de vendange.

Les bilans d'extraction du raisin des composés phénoliques totaux ou « tanins » sont peu nombreux. L'auteur précédent donne les teneurs en tanins suivantes : rafle : 0,065 kg ; pellicules : 0,118 kg ; pépins : 0,048 kg ; soit au total : 0,231 kg de « tanins » pour 100 kg de vendange.

Dans le traité de BENVEGNIN, CAPT et PIGUET (1947), on trouve les pourcentages en tanins suivants : rafle : 3,1 p. 100 ; pellicules : 1,7 p. 100 ; pépins : 6,4 p. 100 ; pulpe : faible teneur ; soit un poids de « tanins » de 0,470 kg pour 100 kg de vendange.

On voit que les bilans diffèrent avec la vendange utilisée ou la technique d'évaluation.

Le but de notre étude étant de suivre globalement, dans une première approche, le rôle des principaux facteurs qui interviennent dans les phénomènes de transposition des matières solides de la vendange dans des milieux hydroalcooliques acides, modèles du vin, nous avons limité nos investigations à l'emploi de méthodes d'évaluation simples et reproductibles.

Dans un premier temps, nous avons essentiellement estimé les teneurs totales et la variabilité des matières colorantes anthocyaniques de différentes vendanges du cépage *Carignan noir*. Les écarts entre plusieurs lots de baies peuvent traduire de façon plus ou moins significative les variations sur les raisins provenant de parcelles de vigne ou de cueillettes différentes.

Dans un deuxième temps, on vérifiera si la couleur d'un vin est conditionnée par la richesse potentielle de chaque matière première.

Simultanément à la mesure des colorants rouges, du type « anthocyanes », la technique expérimentée dans cette recherche est apparue grossièrement représentative de la teneur en substances polyphénoliques totales ou « tannoïdes ».

Sur un même prélèvement d'extrait du raisin (et également dans le cas des vins) avec les mêmes conditions de mesure, il est possible de faire apparaître des variations relatives entre les deux indices de polyphénols considérés.

Les bilans établis sur le raisin doivent permettre l'étude des taux de passage des polyphénols du raisin au vin, ce qui fera l'objet d'un deuxième mémoire.

Précisons que dans le cadre de ces recherches, nous n'avons pas considéré le problème des nombreux pigments anthocyaniques, sous diverses formes à différents pH et dilutions alcooliques, étudiés par BERG (1963), PATAKI (1965), RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET (1965), TIMBERLAKE et BRIDLE (1967), PUISSANT et LÉON (1967) et autres auteurs. Sur ces données, nous avons admis que l'utilisation de milieux hydroalcooliques acides de pH légèrement supérieur à 0,5 n'entraînait pas de dégradation sensible de la nature des pigments.

De même, on ne tiendra pas compte des dissociations possibles des édifices plus ou moins polymérisés qui constituent la majeure partie des substances « tannoïdes ».

Toutefois, les milieux expérimentés légèrement acides présentent l'avantage de diminuer les phénomènes de transformation par oxydation des polyphénols végétaux (DEIBNER et BOURZEIX, 1963).

D'un autre côté, nous n'avons pas étudié de façon systématique les phénomènes « d'extractibilité » des matières colorantes et des tanins en fonction du taux d'alcool,

de l'acidité, des conditions de fermentation et de vinification. Berg et Akiyoshi (1957) ont présenté une étude très complète sur ces divers facteurs et émis quelques hypothèses sur la « semi-perméabilité » des cellules vis-à-vis de la diffusion des polyphénols dans le milieu.

Notre objectif principal a été tout d'abord de tester une méthode commode permettant d'estimer les matières polyphénoliques de chaque vendange en vue d'étudier leur taux de transposition dans les vins.

I. — MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

La matière première

Elle est constituée par des raisins de *Carignan noir* provenant de deux parcelles différentes du Domaine expérimental de Pech Rouge (I. N. R. A., Narbonne, Aude).

a) *Parcelle B_2 :* vigne de 40 ans environ, plantée sur coteau, dans un sol légèrement caillouteux (massif calcaire).

b) *Parcelle 1049 C :* vigne de 8 ans, située en bordure de mer, dans un sol argilo-siliceux (sables).

L'échantillonnage

L'échantillonnage est fait en détachant au hasard, à l'aide de ciseaux, de 1 à 3 baies par grappe et par pied (sur 250 pieds environ). Les 500 à 1 200 baies prélevées pour une parcelle sont ensuite réparties en lots de 100 baies dont on égalisera les poids dans les groupes correspondants à une même vendange (voir tabl. 1).

TABLEAU I

Parcelles	B_2			1 049 C
Date de cueillette	14-9-1967	25-9-1967		28-9-1967
Numéro du groupe	I	II	III	IV
Nombre de lots de 100 baies	3	5	5	5
Poids de 100 baies (en g) (lots égalisés)	206	216	238,5	217
Poids des pellicules de 100 baies (moy.) en g	27,7	31,34	32,64	33,26
Poids des pépins de 100 baies (moy.) en g	5,5	3,9	4,06	5,7
Acidité totale (en SO_4H_2 en g/litre)	4,9	4,5	4,5	4,4
pH	—	3,25	3,25	3,25
Sucres (g/litre)	198	201	201	194

Les rafles proviennent de 3 lots de 20 grappes et chaque lot correspond à 5,5 kg de vendange entière.

La séparation des pépins et pellicules est effectuée manuellement à la pince. Les pépins sont lavés rapidement avec un peu d'eau distillée, séchés sur du papier-filtre et triés à la main pour ne conserver que les pépins bien formés et intacts.

Conditions d'extraction

Plusieurs essais préliminaires de diffusion ont été faits, en vue de choisir un solvant satisfaisant pour réaliser une extraction quasi totale des polyphénols du raisin.

Nous avons ainsi testé, en mesurant les quantités de polyphénols dissoutes des pellicules, pépins et rafles, en fonction de la durée de macération, les milieux suivants :

a) Eau ou éthanol à 96 p. 100.

b) Eau ou éthanol à 96 p. 100 en présence de 2 p. 100 d'acide chlorhydrique pur (2 p. 100 en volume).

c) Milieu hydroalcoolique, imitant le vin, constitué par : 10 p. 100 d'alcool, 2 g d'acide tartrique, 2 g de bitartrate de potassium pour 1 litre de solution.

Le solvant d'extraction éthanol-chlorhydrique (2 p. 100 en volume) a été retenu pour établir les bilans en anthocyanes et tannoïdes.

Les extractions du raisin ont débuté 2 à 3 heures après la cueillette (pour limiter toute transformation possible avant l'évaluation des polyphénols sur la matière première fraîche).

La durée de contact pour chaque extraction est en moyenne de 5-7 jours pour les pellicules et 6-8 jours pour les pépins.

Dans le cas de la pulpe, entraînant une petite fraction des colorants, elle est recueillie dans 150 ml de solvant, homogénéisée par broyage au mixer 2 à 3 minutes, puis centrifugée (750 *g*) ; les mesures sont effectuées sur une partie aliquote de l'extrait surnageant (le volume considéré dans les calculs sera la somme : pulpe + solvant).

Mesures et expression des résultats

Dans toutes les mesures, on utilise pour les dilutions le même solvant éthanol-chlorhydrique (2 p. 100 en volume) que celui des extractions (pH voisin de 0,8).

On effectue les courbes d'absorption des extraits, dilués ou non, de 650 à 250 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman, modèle DB-G, muni d'un enregistreur. Un des avantages de cette façon d'opérer est de mettre au même niveau, sur une courbe d'absorption continue du visible à l'UV, les deux sommets spectrophotométriques considérés.

La densité optique à 545 nm exprime un indice de matières colorantes rouges : essentiellement des anthocyanes glucosides, des aglucones et des pseudo-bases exaltées par le milieu acide, que l'on appellera « anthocyanes » en faisant la réserve que ce terme peut avoir un sens plus restrictif (Ribéreau-Gayon et Stonestreet, 1965).

La densité optique à 275-280 nm exprime un indice de matières « tannoïdes » totales (Flanzy et Poux, 1958) ou plus généralement de chromophores de nature phénolique et plus particulièrement des flavanes.

De faibles variations de pH, fonction de la concentration des extraits et de la dilution, sont peu sensibles sur ces deux indices, dans la zone 0,6 à 1,0, d'après également les observations de Swain et Hillis (1959).

A défaut de substances étalons valablement représentatives du mélange de polyphénols de chaque raisin, nous avons préféré exprimer, pour tous les extraits, les matières colorantes et tannoïdes en Unités de Densité Optique (U.D.O.) ; c'est-à-dire : $\log \frac{I_0}{I}$ (à 545 ou 280 nm) $\times$ dilution du prélèvement $\times$ volume d'extrait considéré. Cette unité conventionnelle de calcul traduit, soit une quantité de couleur, soit une quantité de groupes chromophores absorbants à 280 nm pour une quantité de matériel végétal utilisé (ici ordinairement : 100 baies).

II. — RÉSULTATS

Les lots de 100 baies de *Carignan noir* ont été réunis en groupes qui permettent de confronter les divers facteurs qui peuvent influer sur la variabilité de la matière première (tabl. 1).

On peut comparer, par exemple, les deux parcelles B_2 et 1 049 C sur les groupes II et IV avec des dates de cueillette très voisines (25 et 28 septembre) et des poids

moyens de 100 baies semblables (216 et 217 g). Sur la même parcelle B_2, on étudiera le facteur maturité entre le groupe I et la moyenne des valeurs sur les groupes II et III. La différence de poids des baies entre ces deux derniers groupes est à relier à la quantité de couleur extraite, déterminée dans le tableau suivant.

Les bilans totaux en « anthocyanes », exprimés en U.D.O. pour un lot de 100 baies, après 4 extractions des pellicules, sont donnés dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Anthocyanes de 100 baies

	Groupe			
	I	II	III	IV
Nombre de lots	3	5	5	5
Pellicules				
Volume de chaque extraction (ml)	75	100	100	100
1re extraction (1) en U.D.O.	11 250	14 130	15 904	12 090
2e extraction	3 420	2 952	3 504	2 560
3e extraction	885	771	885	590
4e extraction	293	275	311	210
Unités de D.O. pour 100 baies (2)	15 848	18 128	20 604	15 450
Écarts-types en U.D.O.		575	565	965
Écarts-types en p. 100		3,2	2,7	6,25
Pulpe				
Volume d'extrait (moyennes en ml)	330	290	307	292
Unités de D.O. pour 100 baies (1)	380	435	461	555
Anthocyanes de 100 baies (pellicules + pulpe) Total en Unités de D.O.	16 228	18 563	21 065	16 005
p.100 de colorants entraînés avec la pulpe	2,4	2,35	2,20	3,47

(1) Chaque extraction correspond à la moyenne des D.O. des lots de chaque groupe ; c'est-à-dire : $\log \frac{Io}{I}$ (545) × dilution du prélèvement de l'extrait × vol. de l'extrait.

(2) Les quantités totales de couleur extraite exprimées en U.D.O. pour 100 baies sont obtenues en faisant la somme de ces moyennes puis en ramenant au volume d'un seul extrait. La variabilité est établie entre les sommes correspondant à chaque lot de 100 baies.

Dans chaque groupe, toutes les extractions des lots de baies sont faites avec le même volume de solvant et l'on a rapporté les moyennes des résultats sur chaque extrait et la variabilité entre les sommes correspondant à chaque lot.

Dans le tableau 3, on retrouve les mêmes conditions expérimentales que précédemment pour établir les bilans en matières tannoïdes de la pellicule et la pulpe. Quatre extractions assurent une récupération importante de ces matériaux. Toutefois, pour ces mêmes solutions, l'épuisement des pellicules est moins satisfaisant que pour les matières colorantes rouges.

TABLEAU 3.

Matières tannoïdes de 100 baies sans les pépins

	Groupe			
	I	II	III	IV
Nombre de lots	3	5	5	5
Pellicules				
Volume de chaque extraction (ml)	75	100	100	100
1re extraction (1) en U.D.O.	9 000	10 090	11 570	10 734
2e extraction	2 613	2 414	2 780	2 246
3e extraction	825	764	815	605
4e extraction	412	492	505	375
Unités de D.O. pour 100 baies (2)	12 850	13 760	15 670	13 960
Écarts-types en U.D.O.		447	684	699
Écarts-types en p. 100		3,25	4,4	5
Pulpe				
Volume d'extrait (moyennes en ml)	330	290	307	292
Unités de D.O. pour 100 baies (2)	2 142	3 074	3 285	3 490
Matières tannoïdes de 100 baies sans les pépins				
Total en unités de D.O.	14 992	16 834	18 955	17 450
p.100 de tannoïdes entraînés avec la pulpe.	14,3	18,3	17,4	20

(1) Chaque extraction correspond à la moyenne des D.O. des lots de chaque groupe ; c'est-à-dire : $\log \frac{Io}{I}$ (280) × dilution du prélèvement de l'extrait × vol. de l'extrait.

(2) Les quantités totales de tannoïdes extraits exprimées en U.D.O. pour 100 baies sont obtenues en faisant la somme de ces moyennes puis en ramenant au volume d'un seul extrait. La variabilité est établie entre les sommes correspondant à chaque lot de 100 baies.

Le tableau 4 correspond aux bilans d'extraction des matières tannoïdes du pépin avec le même solvant éthanol-chlorhydrique et dans des conditions de diffusion voisines. A la fin de ce tableau, on a donné le bilan total sur les tannoïdes de 100 baies (pellicule + pulpe + pépin) sans tenir compte de l'importance des rafles dans une vendange.

TABLEAU 4. — *Matières tannoïdes des pépins de 100 baies*

	Groupe			
	I	II	III	IV
Nombre de lots	3	5	5	5
Pépins				
Volumes de chaque extraction (ml)	20	25	25	25
1re extraction (1) en U.D.O.	490	641	653	2 364
2e extraction	980	330	312	619
3e extraction	240	310	333	454
4e extraction	190	282	313	294
U.D.O. pour les pépins de 100 baies (2)	1 900	1 562	1 611	3 731
Écarts-types en U.D.O.		152	105	283
Écarts-types en p. 100		9,7	6,5	7,6

(1) Chaque extraction correspond à la moyenne des D.O. des lots de chaque groupe ; c'est-à-dire : $\log \frac{Io}{I}$ (545) × dilution du prélèvement de l'extrait × vol. de l'extrait.

(2) Les quantités totales de couleur extraites exprimées en U.D.O. pour 100 baies sont obtenus en faisant la somme de ces moyennes puis en ramenant au volume d'un seul extrait. La variabilité est établie entre les sommes correspondant à chaque lot de 100 baies.

Bilan total en matières tannoïdes de 100 baies (Somme tableaux 3 + 4)

Total des tannoïdes de 100 baies (pellicules + pulpe + pépins) (en U.D.O.)	16 892	18 397	20 566	21 181
*p.*100 de tannoïdes apportés par les pépins par rapport au total sur les baies	11,3	8,5	7,8	17,6

TABLEAU 5. — *Matières tannoïdes de la rafle*

Lots de 20 rafles sur les raisins du groupe IV (parcelle 1049 C) (g)	261	249	266	Moyenne(1) 255,3
Solvant éthanol pur (100) : 1 litre				
1re extraction en U.D.O. pour 20 rafles	20 000	18 000	20 750	
2e extraction	8 600	8 250	8 750	
3e extraction	2 680	2 620	2 800	
4e extraction	900	1 000	900	
Sommes	32 180	29 870	33 200	$(31,75 \pm 1,8)10^3$
Solvant éthanol 96-HCl 2 % (v) : 1 litre				
5e extraction en U.D.O. pour 20 rafles	8 500	9 900	10 500	
Matières tannoïdes de 20 rafles en UD.O.	39 680	39 770	43 700	environ $41 \cdot 10^3$ (1)

(1) Le bilan $41 \cdot 10^3$ U.D.O. sur 255 g de rafle correspond à 5,5 kg de vendange entière, dont 5,245 kg de baies ou $\frac{5\,245\,g}{217\,g}$ soit 24,2 fois 100 baies de la parcelle 1 049 C, contenant : $21\,181 \times 24,2 = 512 \cdot 10^3$ U.D.O. en tannoïdes c'est-à-dire la rafle apporterait théoriquement 7,4 p. 100 des tannoïdes totaux de la vendange entière.

En effet, il est assez aisé de dissocier expérimentalement l'influence de la rafle des autres éléments constitutifs du raisin. D'autre part, ainsi qu'il sera montré dans la discussion, les bilans et la variabilité des tannoïdes de cette fraction de la vendange posent des problèmes particuliers et leur intérêt est moindre dans le but que nous poursuivons. Toutefois, le tableau 5 permet d'estimer l'apport relatif en tannoïdes de la rafle comparativement à celui des baies dans une vendange.

III. — DISCUSSION

A. — *Diffusion et évolution des polyphénols du raisin dans les milieux hydro-alcooliques*

a) *Cas des pellicules* (tabl. 2).

La figure 1 montre comment s'effectue la diffusion des colorants et tannoïdes des pellicules en fonction de la durée de macération et du milieu solvant utilisé.

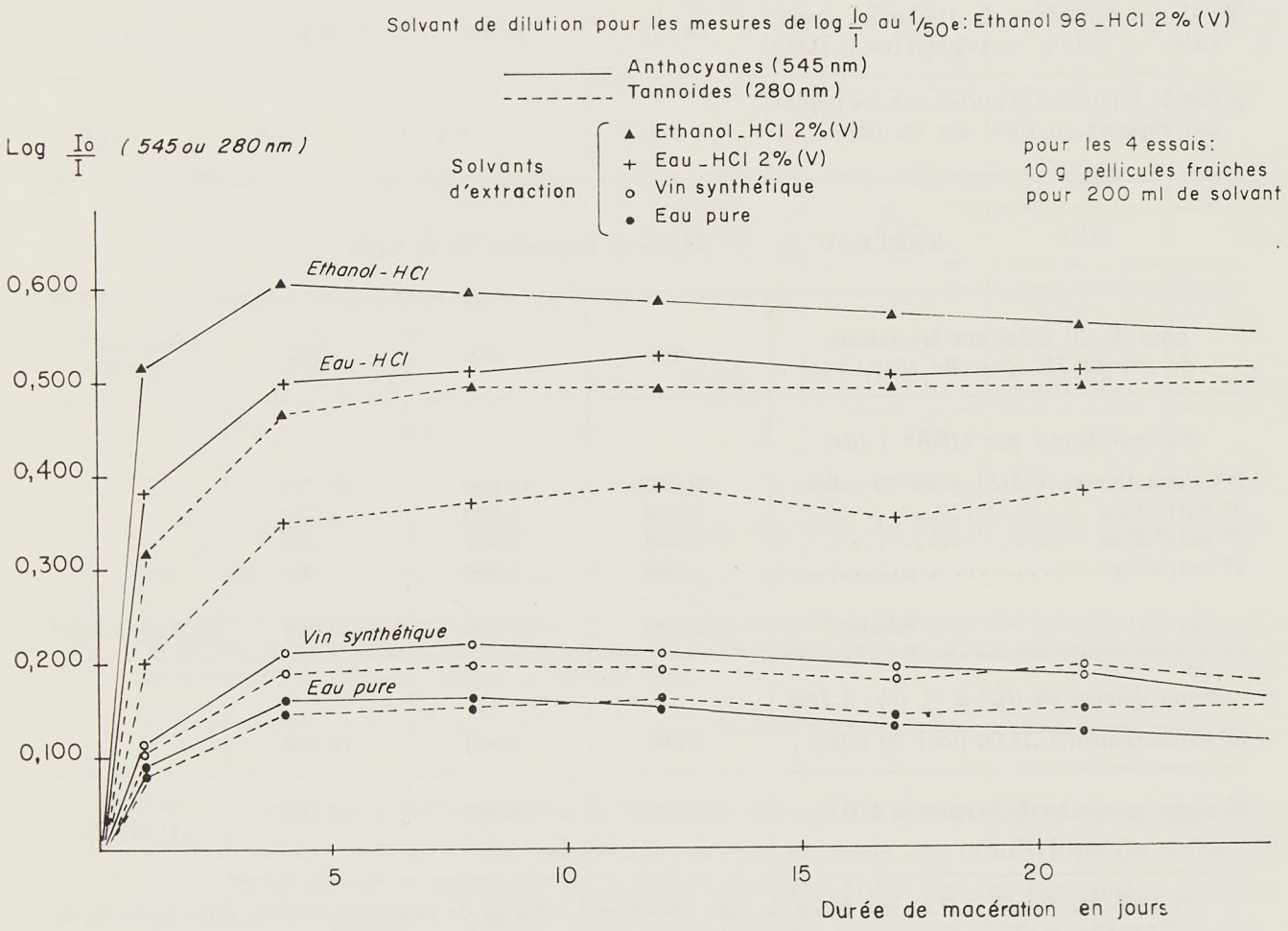


FIG. 1. — *Diffusion des colorants et tannoïdes des pellicules dans différents milieux*

La diffusion des polyphénols est rapide quel que soit le milieu. En quatre jours, on atteint un maximum ; mais alors que les colorants montrent une tendance à diminuer, l'extraction des matières tannoïdes totales se stabilise, ou augmente légèrement. De ces observations découle notre technique d'extraction des pellicules rapportée dans la partie expérimentale, c'est-à-dire 5 à 7 jours de macération dans le solvant éthanol-chlorhydrique.

Dans l'eau pure ou le vin synthétique plus particulièrement (fig. 1), on observe que la D.O. relative aux anthocyanes devient inférieure à la D.O. correspondant aux tannoïdes, après un temps de macération de l'ordre de 10 et 20 jours : ceci traduit une sélectivité par les solvants utilisés des différents composés.

Dans la figure 2, ce phénomène de diffusion sélective apparaît nettement si l'on compare plusieurs extraits successifs jusqu'à ce que les pellicules soient pratiquement

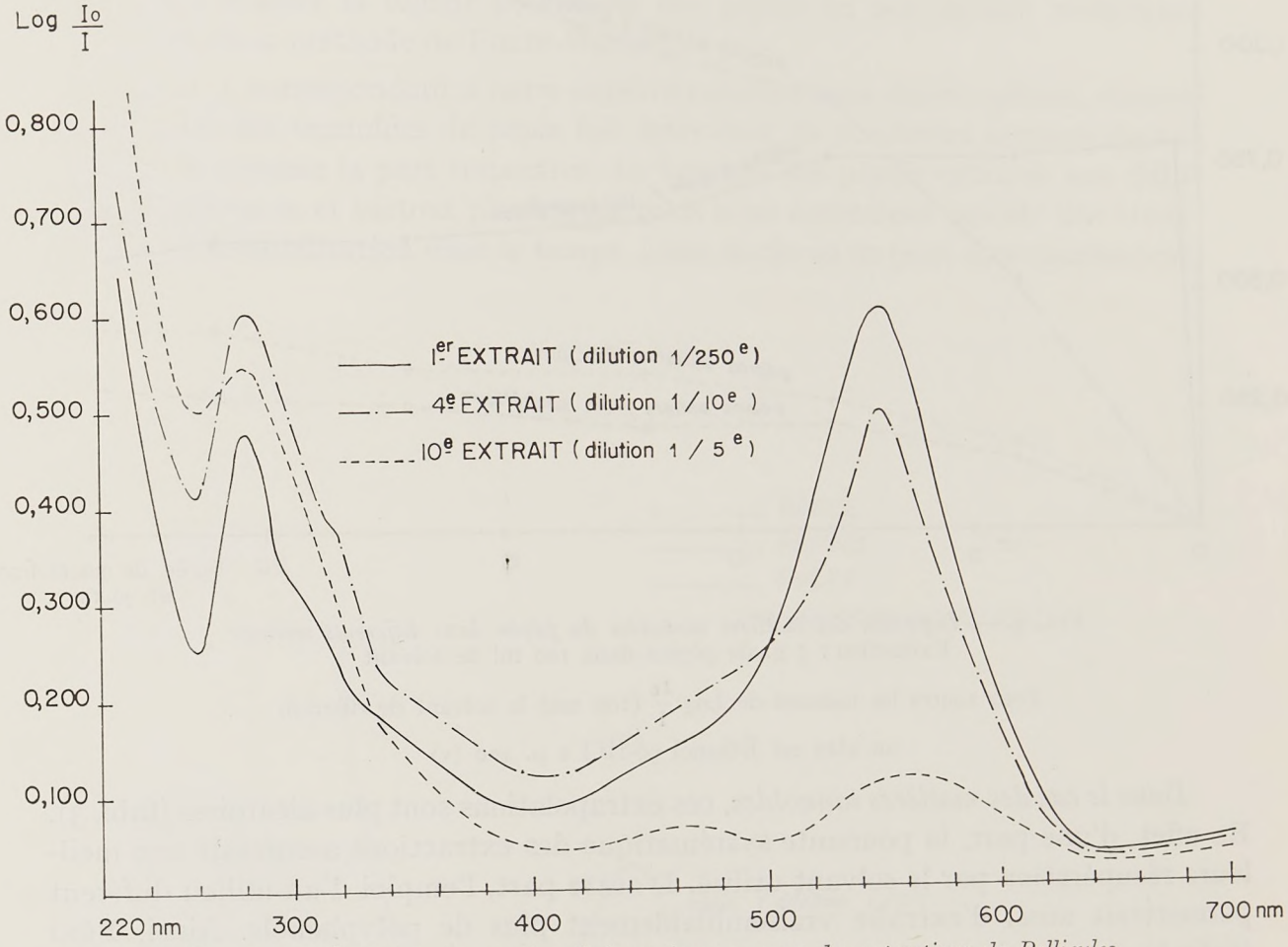


FIG. 2. — *Évolution des courbes d'absorption au cours des extractions de Pellicules* (solvant : Éthanol - HCl 2 p. 100)

décolorées. L'extraction des anthocyanes (D.O. à 545) est plus rapide et plus importante que celle des matières tannoïdes totales (D.O. à 280 nm) dans les premières extractions.

L'extraction des matières colorantes est quasi totale avec le solvant éthanol chlorhydrique dès la 4e extraction. Le tableau 2 montre que d'un extrait à l'autre nous retrouvons moins du 1/3 de la quantité extraite précédemment. Le 4e extrait représente environ 2 p. 100 de la quantité totale. Si l'on poursuit les extractions, on arrive à la décoloration pratiquement totale des pellicules ; après 10 extractions, l'extrait

est encore très légèrement rouge, mais la quantité extraite est infime par rapport aux premières. Par contre, la présence de matières tannoïdes est moins négligeable sur ce 10e extrait et le pic d'absorption correspondant est 5 fois plus fort que celui des anthocyanes (fig. 2) ; la diffusion des matières tannoïdes apparaît plus difficile que celle des colorants rouges (fig. 5).

Nous avons ainsi admis que les bilans en colorants étaient complets et la reproductibilité des mesures valables après 4 extractions successives des pellicules.

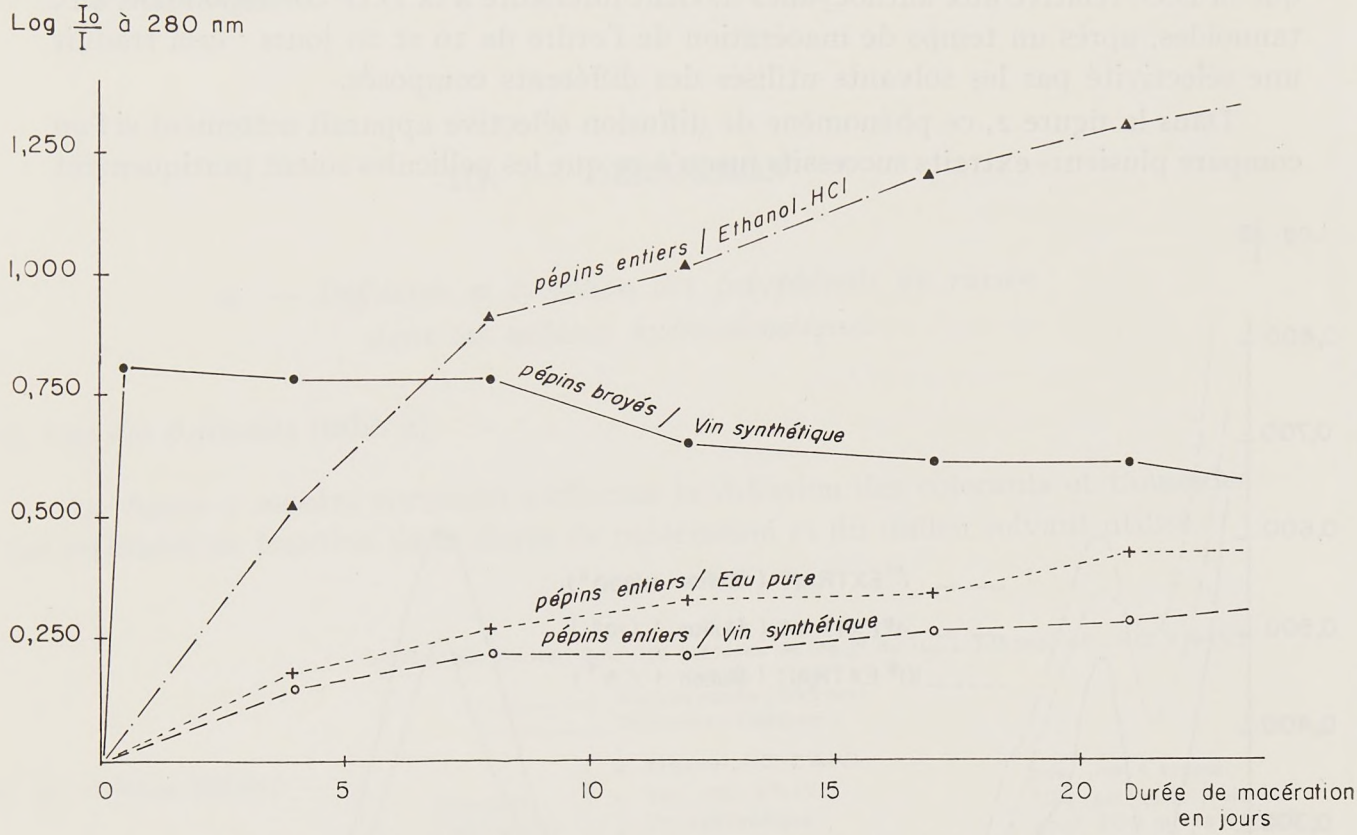


FIG. 3. — *Diffusion des matières tannoïdes du pépin dans différents milieux*
Extraction : 5 g. de pépins dans 100 ml de solvant

Pour toutes les mesures de Log $\frac{I_0}{I}$ (280 nm) le solvant de dilution au 1/20 est Éthanol 96-HCl 2 p. 100 (v)

Dans le cas des matières tannoïdes, ces extrapolations sont plus aléatoires (tabl. 3). En effet, d'une part, la poursuite systématique des extractions assurerait une meilleure récupération par le solvant utilisé. D'autre part, l'emploi d'un milieu différent permettrait aussi d'extraire vraisemblablement plus de polyphénols. Ainsi, PÉRI (1967 *b*) a montré que l'augmentation de la teneur en eau ou de la température, dans l'extraction alcoolique des polyphénols du raisin, entraîne une nouvelle récupération des leucoanthocyanes étudiés par cet auteur. On voit donc que l'extraction totale de l'ensemble des composés phénoliques du raisin pose de nombreux problèmes.

Des essais personnels, effectués à l'aide d'éthanol pur en vue d'éviter les dégradations possibles dues aux acides, ont montré une même progression dans les extractions, mais le bilan en matières colorantes récupérées se retrouve inférieur à celui du solvant éthanol-chlorhydrique ; ceci indépendamment de l'influence du pH au moment des mesures, les dilutions ayant été effectuées dans le même milieu acide. La comparaison de ces deux solvants d'extraction porte sur 4 lots de 100 baies de

même origine et de mêmes caractéristiques (groupe IV). Après 4 extractions avec 75 ml d'éthanol 96°, la D.O. moyenne à 545 nm est de $11 \cdot 10^3$ contre $16 \cdot 10^3$ pour le milieu éthanol-chlorhydrique.

La présence d'un acide minéral ou organique (Atanas, Yankov et Balkandzhiev, 1965) favorise considérablement l'extraction des colorants et des tannoïdes des pellicules du raisin.

b) *Cas des pépins* (tabl. 4).

L'extraction en milieu hydroalcoolique et la diffusion dans le vin des composés phénoliques des pépins ont été étudiées par Singleton et Drapper (1964). Ils ont fait varier de nombreux paramètres et utilisé broyage et extraction par plusieurs solvants pour évaluer la teneur potentielle des pépins en polyphénols réducteurs (dosés à l'aide de la méthode de Folin-Denis).

La figure 3, correspondant à notre expérimentation dans divers milieux, montre que la diffusion des tannoïdes du pépin fait intervenir de nombreux facteurs dont il est difficile de préciser la part respective. Le broyage des pépins entraîne une diffusion plus importante et surtout plus rapide mais nous constatons ensuite une transformation ou insolubilisation dans le temps. Dans ce cas on ne peut dire exactement,

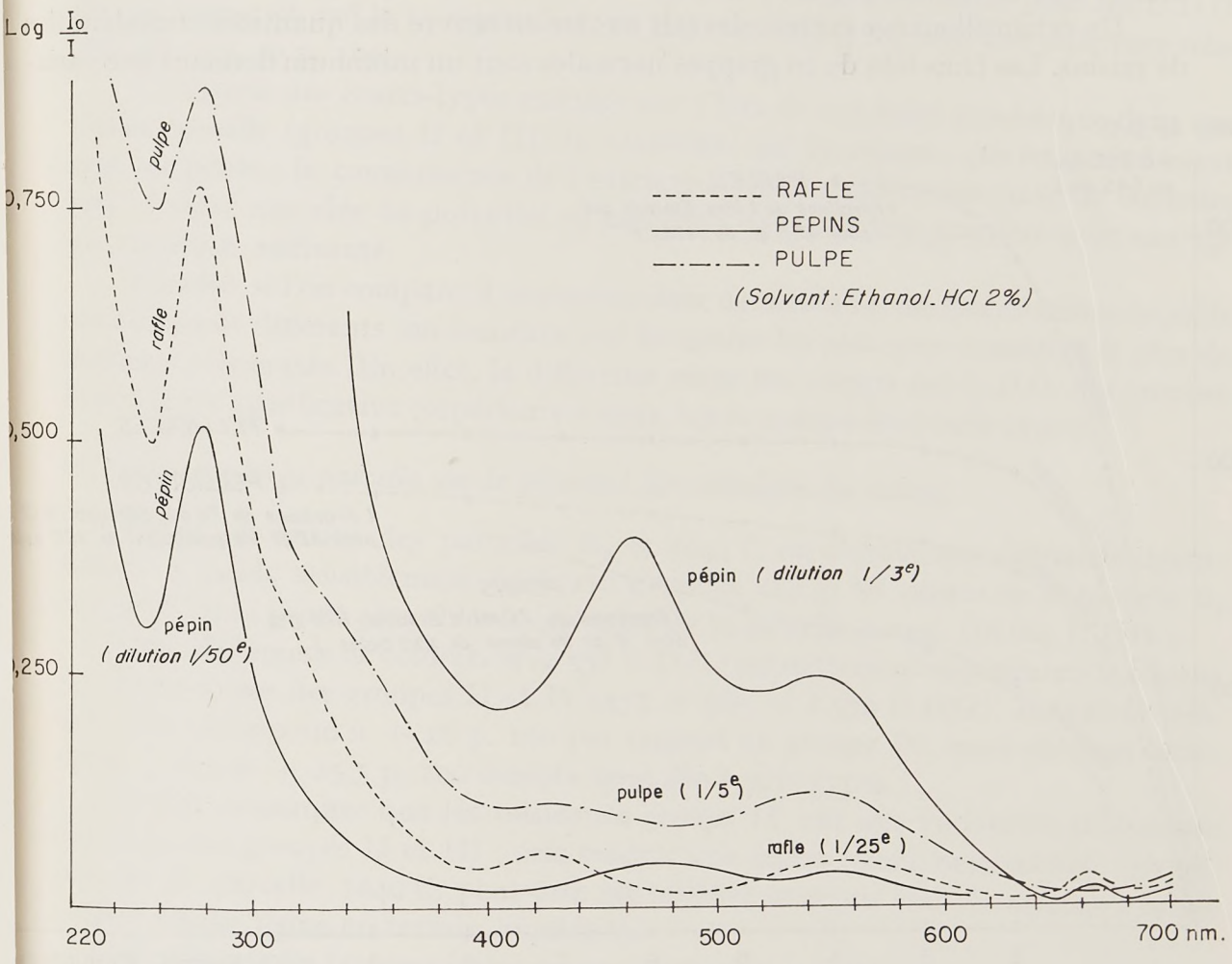


Fig. 4. — *Courbes spectrophotométriques d'extraits de raisin*

dans l'état actuel de nos connaissances, si cette diminution des tannoïdes dans un milieu simulant le vin (pH 3,3) correspond à une oxydation et polymérisation, une dégradation ou un phénomène de précipitation des tanins avec les protéines, par exemple ?

Le meilleur solvant essayé est l'éthanol-chlorhydrique, bien que l'on ait appris récemment que l'on avait une dégradation en milieu acide, à froid, d'une fraction des leucoanthocyanes du pépin (PÉRI, 1967 *a*). Effectivement on obtient des liqueurs rouge orangé avec deux pics d'absorption distincts à 545 et 460 nm (fig. 4), ce qui prouverait la présence de produits de transformation, en proportion faible.

Néanmoins, on peut admettre que l'absorption globale UV, dans la zone 275-280 nm considérée par notre méthode, est représentative, les chromophores dans cette région spectrale étant peu touchés par l'acidification. De plus, avec le solvant éthanol- chlorhydrique on obtient après 6 à 8 jours de macération des pépins entiers sensiblement la même teneur en tannoïdes solubilisés que dans le cas des pépins broyés et laissés, le même temps, dans le solvant vin synthétique (fig. 3). Ces données justifient les conditions de notre technique d'extraction des tannoïdes du pépin.

c) *Cas des rafles* (tabl. 5).

L'extraction totale des matières tannoïdes de la rafle pose encore plus de problèmes que le cas des pépins.

Un échantillonnage correct devrait mettre en œuvre des quantités considérables de raisins. Les trois lots de 20 grappes normales sont un minimum donnant une varia-

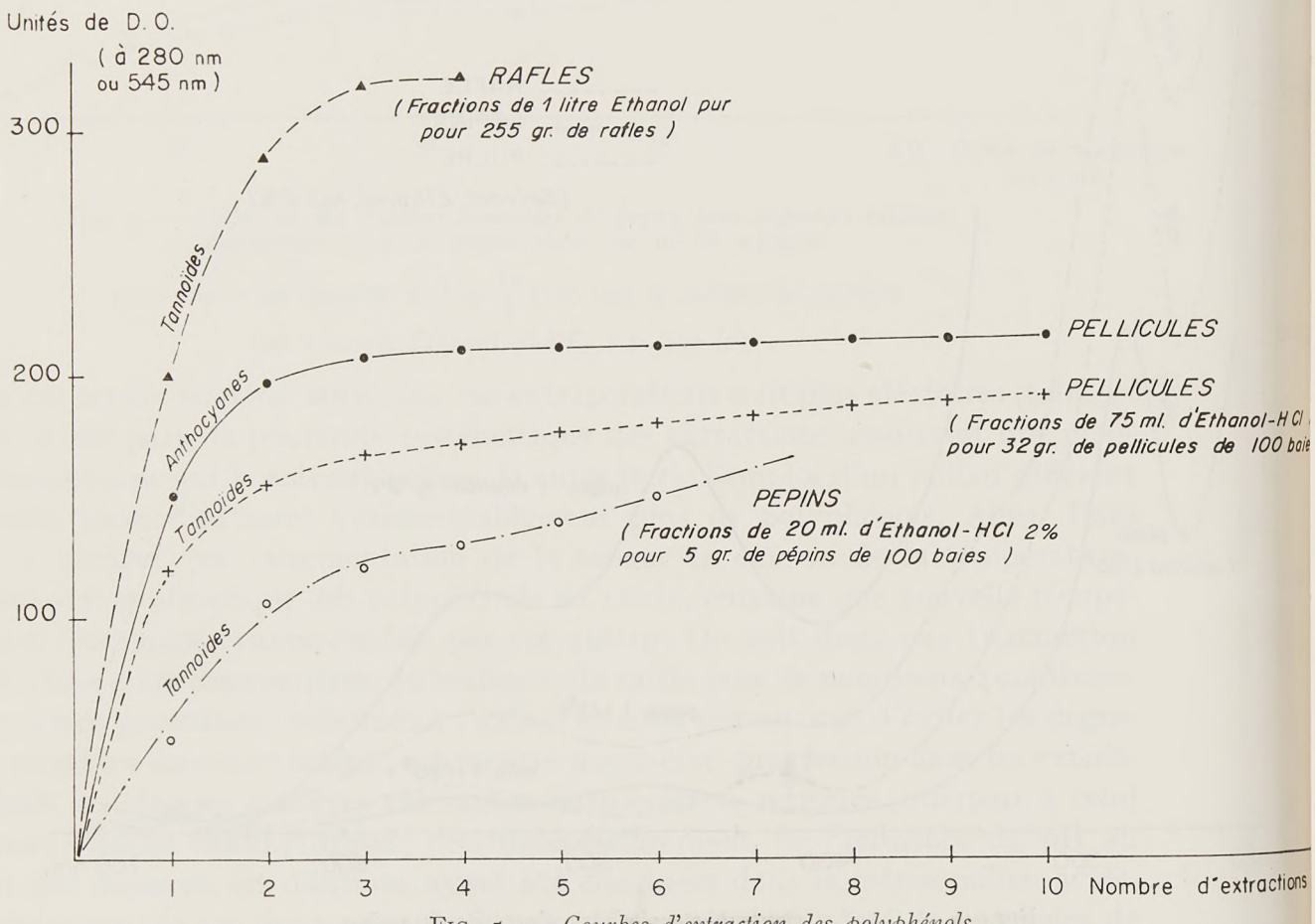


FIG. 5. — *Courbes d'extraction des polyphénols*

bilité de résultats acceptable pour comparer éventuellement des vendanges ou des cépages. Mais, à côté de ce problème matériel, le choix du solvant est délicat. Ainsi l'extraction par de l'éthanol 96 p. 100 est très rapide (fig. 5) et apparemment quasi totale. Mais on constate que l'extraction des rafles par l'éthanol seul n'est pas complète ; en effet, une addition d'acide dans le milieu donne une D.O. supérieure ainsi que le montre la cinquième extraction (tabl. 5). De même, PÉRI (1967 *b*) a montré que l'eau et la chaleur permettent d'extraire une nouvelle fraction des leuco-tannoïdes des rafles.

Ainsi un bilan absolument complet d'extraction des tannoïdes du raisin ne pourrait être effectué que par des extractions multiples avec des milieux différents : solutions alcool + eau à des taux croissants ; solution d'acide ou emploi de solvants plus efficaces ; ceci en évitant toute transformation des polyphénols récupérés.

B. — *Variabilité des matières colorantes du raisin*

L'examen des tableaux 1 et 2 permet la confrontation des facteurs qui peuvent conditionner le potentiel couleur de la matière première.

a) *Influence de l'état de maturité.*

On observe d'abord qu'au cours de la maturation il y a accumulation de matières colorantes dans les baies. L'examen des quantités extraites donne pour les U.D.O. de 100 baies : 16 228 le 14 septembre, 18 563 et 21 065 le 25 ; soit une différence relative de 10 à 30 p. 100.

L'examen des écarts-types calculés sur 5 lots de 100 baies montre que dans une même parcelle (groupes II et III) la variabilité est homogène, que les grains soient gros ou petits ; la connaissance de l'extraction de la matière colorante de 100 baies peut donner une idée du potentiel en pigments de la matière première avec une approximation suffisante.

Ensuite, si l'on compare, à une même date de cueillette, des lots de raisins de poids sensiblement différents, on constate que les grains les plus gros possèdent le plus de matières colorantes. En effet, la différence entre les valeurs des U.D.O. des groupes II et III est significative (supérieure à deux fois la somme des écarts-types).

b) *Influence de la parcelle sur le potentiel de coloration du raisin.*

Entre les raisins des parcelles B_2 et 1049 C, on observe une différence significative. A poids sensiblement égal (216 g contre 217 g) les raisins de la parcelle B_2 (18 563 U.D.O.) sont plus colorés que ceux de la parcelle 1 049C (16 005 U.D.O.).

Cette différence de coloration (2 558 U.D.O.) est nettement supérieure à la somme des écarts-types des groupes II et IV (575 + 965 = 1 570 U.D.O.). En valeur relative, elle correspond à + 16 p. 100 par rapport au groupe IV, mais elle peut varier entre + 6,5 et + 25,5 p. 100 compte tenu des écarts-types.

Il faut remarquer que les raisins du groupe IV ont une variabilité plus élevée que ceux des groupes II et III ; cela traduit une moins bonne homogénéité des raisins de la parcelle 1049 C, peut-être en relation avec un état de maturité moins avancé (vigne jeune en terrain humide ?).

On voit que les facteurs intervenant sur chaque parcelle peuvent être nombreux : différences de sol, de date de plantation, clonales, microclimatiques, culturales, etc.

Il est intéressant de noter qu'en valeur absolue cette différence de pouvoir colorant entre les groupes II et IV (2 558 U.D.O.) est du même ordre de grandeur que la matière colorante totale retrouvée dans un vin après 4 jours de cuvaison en cuve industrielle (voir 2e mémoire : taux de passage dans les vins). Ces données tendent à montrer l'influence possible du potentiel de chaque vendange sur la qualité des vins.

Les potentiels de coloration entre les deux parcelles sont nettement différents. On constate ici que les raisins de la parcelle âgée (B_2) sont les plus riches en matières colorantes, ce qui est une confirmation d'observations relevées souvent dans la pratique.

C. — *Variabilité des matières tannoïdes du raisin*

Compte tenu de la difficulté d'extraction totale de cet ensemble de composés phénoliques, nous pouvons néanmoins faire quelques remarques.

a) *Tannoïdes des baies sans les pépins* (tabl. 3).

Les écarts-types ne sont pas très homogènes entre les lots de 100 baies des 3 groupes étudiés (447, 686 et 699 U.D.O.) ; on peut adopter le plus élevé (soit un coefficient de variation de l'ordre de 5 p. 100).

Les différences entre les groupes I, II et III sont grossièrement significatives de l'état de maturité ; il y a augmentation des polyphénols totaux extractibles avec le grossissement de la baie.

Par contre, la différence entre les groupes II et IV est faible et négative (616 U.D.O.), alors qu'elle était nettement significative et positive pour la couleur. Pratiquement, on peut avancer que les raisins de la parcelle B_2 possèdent relativement plus de colorants et légèrement moins de tannoïdes que ceux de la parcelle 1049 C. Cette observation peut être confirmée en étudiant le rapport $\frac{\text{Anthocyanes}}{\text{Tannoïdes}}$ sur chaque extrait.

En effet, considérons par exemple le premier extrait, on note en D.O. :

$$\text{Groupe II} : \frac{\text{Anthocyanes}}{\text{Tannoïdes}} = \frac{141{,}3}{100{,}9} = 1{,}30$$

$$\text{Groupe IV} : \frac{\text{Anthocyanes}}{\text{Tannoïdes}} = \frac{120{,}9}{107{,}34} = 1{,}13$$

De même, sur l'ensemble des extraits (pellicules + pulpe) en U.D.O. ;

$$\text{Groupe II} : \frac{18\,563}{16\,834} = 1{,}10$$

$$\text{Groupe IV} : \frac{16\,005}{17\,450} = 0{,}92$$

Chaque groupe, ou chaque vendange, se caractériserait donc, plus ou moins, par un rapport différent entre les deux indices considérés. Nous verrons ultérieurement que les écarts peuvent être encore plus sensibles si l'on tient compte des tannoïdes apportés par les pépins.

b) *Tannoïdes extraits des pépins* (tabl. 4)

Les pourcentages des écarts, de l'ordre de 7 à 10 p. 100, sur les extraits du pépin, ne permettent pas de conclusions absolues. Toutefois, ces bilans approximatifs sur les tannoïdes des pépins de différentes vendanges permettent quelques remarques.

L'examen du tableau 4 nous montre qu'à deux stades de maturation différents, les pépins cèdent au milieu éthanol chlorhydrique moins de matières tannoïdes lorsque la maturation du fruit est plus avancée. Par extension, on peut admettre que les pépins de raisins mûrs donneront au vin moins de tanins que ceux des raisins de maturité moins avancée.

De plus, pour un même cépage, les quantités de matières tannoïdes extractibles des pépins de raisins peuvent être très différentes selon leur origine (comparaison des valeurs des groupes II et III avec les valeurs du groupe IV). Ces différences sur la vendange des deux parcelles étudiées peuvent porter à la fois sur les conditions de maturité, écologiques ou même clonales. Il y a là une observation nouvelle qui mériterait une étude systématique afin d'en déterminer plus valablement les conséquences pratiques, les tannoïdes des pépins apportant au vin une grande partie de ces composants qui sont en relation directe avec les qualités organoleptiques.

c) *Tannoïdes extraits de la rafle* (tabl. 5)

La rafle pose tout d'abord le problème d'un échantillonnage sur des quantités importantes de raisin. La variabilité sur 3 lots de 20 rafles donne un pourcentage de variation de l'ordre de 6 à 7 p. 100, après les 5 extractions réalisées.

Le bilan sur un lot (note 1 du tabl. 5) représente 7,4 p. 100 des tannoïdes totaux de la vendange correspondante (baies + rafles). L'influence de la rafle sur la richesse des vins en ces composants serait donc relativement faible par rapport à celle de la baie. Cette donnée apparaît infirmée par l'importance que l'on accorde généralement à l'éraflage dans les vinifications. Mais, il reste à préciser les facteurs qui conditionnent le potentiel en tannoïdes de la rafle (état de maturité ou de lignification, clone, conditions écologiques).

CONCLUSION

L'extraction quasi totale des colorants anthocyaniques de la baie de raisin a été réalisée à l'aide du solvant éthanol chlorhydrique.

Pour les matières tannoïdes totales, les bilans d'extraction sur les quatre éléments constitutifs du raisin sont plus aléatoires, particulièrement pour les pépins et surtout les rafles.

La variabilité des teneurs en polyphénols, établie à l'aide de la comparaison de lots de 100 baies sur des vendanges d'origines différentes, montre l'influence possible des divers facteurs qui caractérisent chaque matière première. Ainsi, les teneurs en matières colorantes anthocyaniques de la vendange, pour un même cépage, le *Carignan noir*, varient de façon significative avec l'état de maturité et la parcelle, c'est-à-dire avec les conditions écologiques et clonales dans un vignoble. Ces différences sur le potentiel couleur ou tannoïdes d'une matière première peuvent expli-

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (2), 111-127.

EXTRACTION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DU RAISIN

II. — Taux de passage dans les vins

S. AUBERT, C. POUX

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

On a évalué, sur plusieurs lots de *Carignan noir*, les teneurs en matières colorantes anthocyaniques et en tannoïdes totaux sur les extraits des différentes parties constitutives du raisin, puis celles des vins correspondants.

Dans la littérature œnologique, ces bilans du raisin au vin sont particulièrement rares, vraisemblablement à cause de la difficulté d'extraction totale de la vendange (problème traité dans la première partie de ce travail, Aubert et Poux, 1969).

Les taux de transposition des polyphénols du raisin au vin varient sensiblement avec, d'une part, la richesse potentielle de la matière première et, d'autre part, les conditions de vinification.

Cette recherche essaye de préciser l'importance respective de ces deux facteurs sur la composition des vins en colorants et tanins polyphénoliques.

Sur un plan pratique, cette étude suggère l'adaptation des techniques à la qualité de chaque vendange.

INTRODUCTION

Le but de cette recherche est d'étudier, dans le cas du cépage le plus répandu dans les régions méridionales de France, le *Carignan noir*, l'influence respective de la matière première et de la vinification sur la richesse des vins en composés polyphénoliques du type : colorants anthocyaniques et matières tannoïdes.

Dans une première partie de cette étude (Aubert et Poux, 1969), nous avons déterminé la richesse totale d'une vendange en matières colorantes rouges et estimé les composés phénoliques totaux extractibles.

La variabilité des teneurs en ces constituants du raisin est donnée entre des lots de 100 baies de vendanges différentes, plus particulièrement sur les apports respectifs de la pellicule, pulpe et pépins et entre des lots de 20 rafles. On peut relever des écarts significatifs en fonction de la parcelle de vigne, de l'état de maturité ou de grosseur des baies. Ce potentiel en substances polyphénoliques des éléments variables de chaque matière première apparaît conditionner quantitativement et qualitativement les vins correspondants.

Ce deuxième mémoire traite plus spécialement des taux de passage ou de transposition des polyphénols du raisin au vin en fonction de divers types de vinification, c'est-à-dire des facteurs purement technologiques qui conditionnent l'utilisation de la matière première et sur lesquels on peut agir, dans les conditions les plus habituelles de la pratique.

Les travaux de NÈGRE (1942) apportent une première détermination précise des tanins récupérés dans les vins en fonction des éléments de la vendange. Ils se penchent surtout sur l'influence respective des différentes parties du raisin et sur la distinction entre œnotanins et polyphénols non tanins des vins. Cet auteur, sur la base des données de VENTRE (1931) sur la composition générale de la vendange, indique que le taux de passage des tanins des matières solides du raisin au vin est, dans le cas de l'*Aramon*, de l'ordre de 10 p. 100. Ce chiffre laisserait prévoir une extraction très incomplète des tanins polyphénoliques, ainsi que des colorants rouges. Cependant, on doit noter que ce coefficient d'extraction porte sur la comparaison de résultats globaux observés sur un même cépage, mais que la matière première qui a servi à évaluer les teneurs totales en tanins n'est pas identique à celle qui a été utilisée pour l'élaboration des vins.

D'après RIBÉREAU-GAYON (1960), la matière colorante du raisin, rassemblée presque exclusivement dans les pellicules, peut se retrouver avec un taux de transposition de 60 à 80 p. 100 dans le vin (expérimentations de FERRE (1956) et PACOTTET (1926)). Pour ces auteurs, l'extraction des colorants rouges apparaîtrait, au contraire, particulièrement facile. Cependant, les méthodes par lesquelles on est arrivé à ces résultats ne définissent pas toutes les conditions de cette évaluation.

Devant ces incertitudes, il nous a semblé utile de préciser ces taux de transposition, ou de conservation, en colorants et matières tannoïdes totales pour une technique d'évaluation choisie, entre, d'une part, une matière première déterminée et, d'autre part, les vins correspondants obtenus dans diverses conditions de fermentation et de macération.

On ne tiendra pas compte dans cette recherche des différences qualitatives importantes entre pigments colorés du raisin et du vin, de même entre les polyphénols divers que nous englobons dans le titre matières tannoïdes totales. Toutefois, quantitativement, on supposera que l'étude comparée d'indices de colorants et tanins, donnés par notre technique d'évaluation, permet de tirer quelques enseignements pratiques, en attendant que des méthodes individuelles permettent des bilans plus exhaustifs.

I. — MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

La matière première

Toutes les données relatives à la matière première de nos vinifications ont fait l'objet d'un travail précédent (AUBERT et POUX, 1969).

Élaboration des vins

a) *Les vins de la parcelle* B_2

Ils ont été obtenus à partir d'environ 150 kg de vendange entière, prélevée sur l'ensemble de la parcelle, éraflée à la main, puis soumise à un léger pressurage pour isoler le moût d'un gâteau formé des pellicules et pépins. Le moût a été sulfité à la dose de 5 g/hl.

Des microvinifications comparatives ont été effectuées en bonbonnes sur 10 à 15 litres. Au moût homogène ont été ajoutées des quantités proportionnelles de pellicules, pépins ou rafles en fonction du type de vinification que l'on désirait obtenir, selon un protocole déjà éprouvé par PACOTTET (1926), FLANZY et POUX (1958), RIBÉREAU-GAYON (1960). On décuve lorsque la densité est inférieure à 1,000.

Une bonbonne est réservée à une vinification par macération carbonique sur des baies entières avec pédicelle mais sans rafle.

L'étude de l'influence de la teneur alcoolique sur le taux en colorants et tannoïdes du vin fini a été réalisée de la façon suivante :

— dans un cas, on a remplacé une partie des moûts par de l'eau de façon à abaisser la teneur en sucre de 17 g par litre, soit 1 degré d'alcool ;

— dans un autre cas, on a ajouté du saccharose de façon à obtenir un vin plus riche de 1 degré d'alcool.

Ces conditions permettent d'apprécier ce que peut apporter une variation de 20 p. 100 dans la teneur en alcool, ce qui est un écart normal entre les degrés alcooliques des vins de *Carignan noir*.

b) *Les vins de la parcelle 1049 C*

Ils ont été obtenus selon la pratique la plus courante dans les régions méridionales : vendange entière foulée et macération en cuve de ciment (110 hl) ; le sulfitage de la vendange est à 5 g par hl. Les durées de cuvaison vont de 1 à 7 jours ; on effectue des prélèvements de 15 litres de jus de goutte en bonbonnes où se termine la fermentation.

Mesures et expression des résultats

L'évaluation des colorants et tannoïdes des vins est effectuée exactement dans les mêmes conditions que pour les extraits du raisin.

Après dilution des vins 50 ou 200 fois dans le solvant éthanol chlorhydrique (2 p. 100 en volume et pH voisin de 0,8), on note les absorptions spectrophotométriques des colorants rouges (à 545 nm) et des tannoïdes totaux (à 280 nm). Les résultats sont exprimés en Unités de Densité Optique comme pour les solutions d'extraction des polyphénols du raisin (AUBERT et POUX, 1969).

Les rendements de transposition des colorants et tannoïdes de la matière première au vin ont été calculés sur les bases suivantes :

— *Parcelle* B_2. Pressurage réduit avec un pressoir à main ; nous admettons : 130 kg de vendange dont 5,500 kg de rafle pour 100 litres de vin fini ; soit : 1,245 kg de baies donnant 1 litre de vin. Sachant que le poids moyen des baies a une valeur déterminée, soit, par exemple, 2,27 g par baie (exemple pris sur les données du tableau 1 dans : AUBERT et POUX, 1969) pour obtenir 1 litre de vin il faut ainsi : $\frac{1245}{2,27} = 550$ baies.

Pour obtenir le rapport de transposition baie/vin, on comparera les Unités de D.O. totales de 1 litre de vin aux U.D.O. totales des différentes extractions de 550 baies. Comme on a exprimé les résultats par 100 baies, ces dernières, pour pouvoir être comparées à 1 litre de vin, devront être multipliées par le rapport $\frac{550}{100}$ soit 5,5.

— *Parcelle 1049 C*. Pressurage industriel dans un pressoir horizontal (type Vaslin) ; on admet : 125 kg de vendange dont 5,500 kg de rafles pour 100 litres de vin fini, soit : 1,195 kg de baies pour obtenir 1 litre de vin. Avec un poids moyen de 2,17 g par baie (pour les raisins du groupe IV) il faudrait pour 1 litre de vin $\frac{1\,195}{2,17}$ g, soit environ 550 baies.

Le coefficient de comparaison entre la D.O. de 100 baies et la D.O. de 1 litre de vin est ici aussi de 5,50.

Le pourcentage de transposition ou de passage des polyphénols du raisin au vin peut ainsi s'exprimer, dans les deux cas :

$$\frac{\text{U.D.O. de 1 litre de vin}}{\text{U.D.O. de 100 baies de raisin} \times 5,5 \times 100}$$

Au numérateur, la teneur des vins en polyphénols est obtenue directement. Par contre, au dénominateur, la richesse potentielle en anthocyanes et matières tannoïdes des raisins correspondants est déterminée à l'aide des bilans sur les baies établis dans notre travail précédent (AUBERT et POUX, 1969. Technique destimation d'une vendange, tableaux 1*, 2*, 3*, 4* et 5*).

— Pour les vins de la parcelle B_2, les raisins correspondent aux groupes II et III, dont on fait la moyenne de chaque bilan.

— Dans le cas de la parcelle 1049 C, la vendange correspond aux raisins du groupe IV. Les valeurs en U.D.O. de ce dénominateur, correspondant aux extractions des différents éléments des raisins nécessaires pour 1 litre de vin (550 grains), sont les suivantes :

Vendange de la parcelle B_2

Anthocyanes (tabl. 2*) $= \frac{18\,563 + 21\,065}{2} \times 5{,}5 = 109 \times 10^3$ U.D.O.

Matières tannoïdes (pulpe + pellicules) (tabl. 3*) $= \frac{16\,834 + 18\,955}{2} \times 5{,}5 = 98{,}5 \times 10^3$ U.D.O.

Matières tannoïdes des baies entières (pellicules + pulpe + pépins) (tabl. 4*) $= \frac{18\,397 + 20\,566}{2} \times 5{,}5 = 107{,}15 \times 10^3$ U.D.O.

Vendange de la parcelle 1049 C

Anthocyanes (tabl. 2*) $= 16\,005 \times 5{,}5 = 88 \times 10^3$ U.D.O.

Matières tannoïdes (pulpe + pellicules) (tabl. 3*) $= 17\,450 \times 5{,}5 = 96 \times 10^3$ U.D.O.

Matières tannoïdes des baies entières (tabl. 4*) (pellicules + pulpe + pépins) $= 21\,181 \times 5{,}5 = 116{,}5 \times 10^3$ U.D.O.

Cas des rafles. — On a admis que 5,500 kg de rafles fraîches correspondent à 100 litres de vin, dans le cas du raisin *Carignan noir* de la vendange 1967. Trois lots de 20 grappes donnent 261, 249 et 266 g de rafles, soit une moyenne de 255 g qui contiennent $41 \cdot 10^3$ U.D.O. (tabl. 5*). La rafle (55 g) pourrait donc apporter à 1 litre de vin, si la transposition était totale, une quantité de tannoïdes de l'ordre de :

$$\frac{41 \cdot 10^3 \times 55}{255} = 8{,}8 \cdot 10^3 \text{ U.D.O.}$$

II. — RÉSULTATS

Ils sont rassemblés dans les tableaux 1 à 4.

Dans les deux premiers, l'extraction quasi totale des colorants rouges de toute la vendange ayant été réalisée, les taux de passage ou de récupération rapportés peuvent être considérés comme absolus.

Dans le cas de la transposition des tannoïdes du raisin au vin, ces taux sont relatifs et supérieurs à la réalité. En effet, les bilans sur la matière première, pour ce groupe de constituants, ne peuvent être que partiels par la technique proposée, ainsi qu'il a été dit dans un précédent mémoire (AUBERT et POUX, 1969).

D'autre part, pour un vin donné, on peut rapporter plusieurs taux de transposition en fonction des tannoïdes apportés par chaque élément constitutif de la grappe. Ainsi, le vin rosé pourrait être calculé sur les tannoïdes apportés par la pulpe seule, en supposant une vinification en blanc parfaite sans phénomène de macération ou extraction mécanique. De même, le vin de vendange entière devrait tenir compte non seulement des tannoïdes apportés par les baies, mais aussi de ceux de la rafle. Nous verrons dans la discussion comment la difficulté d'extraction totale de cette partie du raisin a été contournée pour estimer son importance dans la vinification (comparaison vendange éraflée et vendange entière).

TABLEAU I

Anthocyanes des vins de la parcelle B_2

Influence du type de vinification		Anthocyanes du vin	Anthocyanes de la vendange	Taux de récupération par rapport aux extraits sur les baies (pellicules + pulpe) (%)
Essais macération et température de fermentation	Durée de cuvaison (jours)	Unités de D.O. pour 1 litre de vin	Unités de D.O. pour 500 baies	
			Raisins des groupes II et III	
(1) Vin rosé — fermentation à 25°C	10	$1{,}80 \times 10^3$	109×10^3	1,65
(2) Vendange éraflée à 25°C	8	$29{,}25 \times 10^3$	—	26,8
(3) Vendange entière à 25°C	9	$29{,}00 \times 10^3$	—	26,6
(4) Vendange entière — 1° d'alcool à 25°C	9	$27{,}00 \times 10^3$	—	24,8
(5) Vendange entière + 1° d'alcool à 25°C	7	$28{,}40 \times 10^3$	—	26,0
(6) Vendange entière — Essai à 35°C	10	$31{,}25 \times 10^3$	—	28,6
(7) Macération carbonique à 25°C		$40{,}00 \times 10^3$	—	36,7

TABLEAU 2

Anthocyanes des vins de la parcelle 1049 C

Vinification en cuve (110 hl)		Anthocyanes du vin	Anthocyanes de la vendange	Taux de récupération par rapport aux extraits sur les baies (pellicules + pulpe) (%)
Vendange entière	Durée de cuvaison	Unités de D.O. pour 1 litre de vin	Unités de D.O. pour 500 baies	
			Raisins du groupe IV	
1er prélèvement	0 heure	$1{,}60 \times 10^3$	$88{,}0 \times 10^3$	1,82
2e prélèvement	12 heures	$3{,}75 \times 10^3$	—	4,26
3e prélèvement	1 jour	$5{,}60 \times 10^3$	—	6,36
4e prélèvement	36 heures	$6{,}00 \times 10^3$	—	6,82
5e prélèvement	2 jours	$6{,}00 \times 10^3$	—	6,82
6e prélèvement	3 jours	$11{,}60 \times 10^3$	—	13,20
7e prélèvement	4 jours	$13{,}60 \times 10^3$	—	15,45
8e prélèvement	5 jours	$16{,}75 \times 10^3$	—	19,05
Vin de goutte	6 jours	$17{,}60 \times 10^3$	—	20,00
Vin de presse	—	$28{,}50 \times 10^3$	—	32,40
Vin du mélange	—	$19{,}50 \times 10^3$	—	22,15

TABLEAU 3

Matières tannoïdes des vins de la parcelle B_2

Influence du type de vinification		Tannoïdes du vin	Tannoïdes de la vendange	Taux de récupération par rapport aux extraits sur les baies	Indice de composition du vin
Essais macération et température de fermentation	Durée de cuvaison (jours)	Unités de D.O. pour 1 litre	Unités de D.O. de 550 baies	% par rapport au bilan sur la pellicule + pulpe + pépins	D.O. 545 nm / D.O. 280 nm
				(%)	
(1) Vin rosé — fermentation à 25°C	10	$8{,}10 \times 10^3$	Raisins des groupes II et III	7,6	0,222
(2) Vendange éraflée à 25°C	8	$33{,}50 \times 10^3$		31,2	0,873
(3) Vendange entière à 25°C	9	$44{,}80 \times 10^3$		41,8	0,646
(4) Vendange entière — 1° d'alcool à 25°C	9	$42{,}75 \times 10^3$	Pulpe + Pellicules + Pépins = $107{,}15 \times 10^3$	39,9	0,631
(5) Vendange entière + 1° d'alcool à 25°C	7	$45{,}00 \times 10^3$		46,6	0,631
(6) Vendange entière, essai à 35°C	10	$50{,}00 + 10^3$		46,6	0,624
(7) Macération carbonique à 25°C		$53{,}60 \times 10^3$		50,0	0,747

TABLEAU 4

Matières tannoïdes des vins de la parcelle 1049 C

Vinification en cuve (110 hl)		Tannoïdes du vin	Tannoïdes de la vendange	Taux de récupération par rapport aux extraits		Indice de composition du vin
Vendange entière	Durée de cuvaison	Unités de D.O. pour 1 litre	Unités de D.O. de 550 baies	Pellicule + pulpe + pépins (%)	Pellicule + pulpe + pépins + rafles (%)	D.O. 545 nm / D.O. 280 nm
1er prélèvement	0 heure	$14,5 \times 10^3$	Raisins du groupe IV	12,5	11,6	0,110
2e prélèvement	12 jours	$15,8 \times 10^3$		13,6	12,6	0,238
3e prélèvement	1 jour	$17,1 \times 10^3$		14,7	13,7	0,328
4e prélèvement	36 heures	$17,9 \times 10^3$	Pellicules + pulpe + Pépins $= 116,5 \times 10^3$	15,4	14,3	0,335
5e prélèvement	2 jours	$18,75 \times 10^3$		16,1	15,0	0,320
6e prélèvement	3 jours	$26,7 \times 10^3$		22,9	21,3	0,435
7e prélèvement	4 jours	$31,2 \times 10^3$	Pellicules + pulpe + Pépins + rafles $= 116,5 + 8,8 = 125,3 \times 10^3$	26,8	24,9	0,436
8e prélèvement	5 jours	$35,75 \times 10^3$		30,7	28,5	0,468
Vin de goutte	6 jours	$36,1 \times 10^3$		31,0	38,8	0,488
Vin de presse	—	$61,0 \times 10^3$		52,3	48,7	0,467
Vin de mélange	—	$41,8 \times 10^3$		35,9	33,4	0,467

La figure 1 illustre l'enrichissement des vins par le phénomène de macération en cuve, sur la base des deux indices de polyphénols proposés dans cette étude. Pour l'intervalle de température de fermentation noté et avec un décuvage à une densité

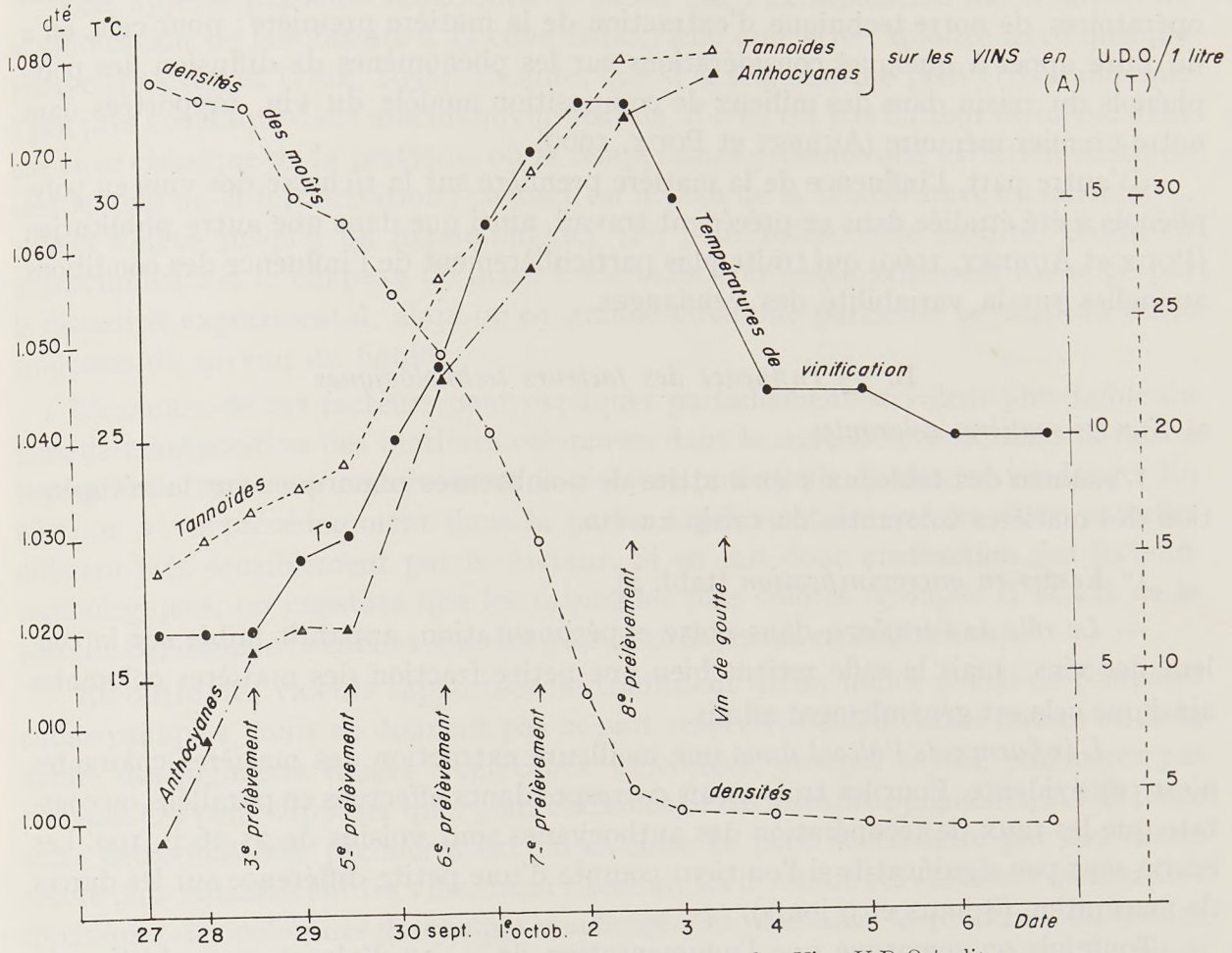


FIG. 1. — △ Tannoïdes ▲ Anthocyanes sur les Vins U.D.O./1 litre

inférieure à 1 000, on observe que l'extraction des polyphénols n'avait pas atteint son maximum après 6 jours de cuvaison. D'autre part, la proportion anthocyanes-tannoïdes augmente sensiblement avec la durée de macération dans les conditions de cette expérimentation.

III. — DISCUSSION

A. — *Observations générales* (tabl. 1 à 4)

La première conclusion qui se dégage des tableaux précédents est que les taux de transposition ou de passage dans le vin des polyphénols du raisin sont faibles.

Les vins rouges de la parcelle B_2 (essais en microvinification) contiennent de 25 à 37 p. 100 des matières colorantes du raisin (tabl. 1) et moins de 31 à 50 p. 100 des matières tannoïdes des baies seules (tabl. 3), sans tenir compte de la quantité apportée par la rafle qui est de l'ordre du quart de la quantité totale contenue dans le vin.

Les vins de la parcelle 1049 C (essais en cuve de 110 hl) contiennent moins de 32 p. 100 des colorants du raisin (tabl. 2) et moins de 52 p. 100 des matières tannoïdes des baies (tabl. 4) après une semaine de cuvaison de la vendange entière.

Pour interpréter ces résultats globaux, il faut, d'une part, justifier les conditions opératoires de notre technique d'extraction de la matière première ; pour cela, on a dû faire appel à quelques considérations sur les phénomènes de diffusion des polyphénols du raisin dans des milieux de composition modèle du vin, rapportées dans notre premier mémoire (AUBERT et POUX, 1969).

D'autre part, l'influence de la matière première sur la richesse des vins en polyphénols a été étudiée dans ce précédent travail, ainsi que dans une autre publication (POUX et AUBERT, 1969) qui traite plus particulièrement de l'influence des conditions annuelles sur la variabilité des vendanges.

B. — *Influence des facteurs technologiques*

a) *Sur les matières colorantes.*

L'examen des tableaux 1 et 2 attire de nombreuses remarques sur la récupération des matières colorantes du raisin au vin.

1° *Essais en microvinification* (tabl. 1).

— *Le rôle de l'éraflage*, dans notre expérimentation, apparaît faible sur la couleur des vins ; mais la rafle retient bien une petite fraction des matières colorantes ainsi que cela est généralement admis.

— *L'influence de l'alcool* dans une meilleure extraction des matières colorantes n'est pas évidente. Pour les trois essais correspondants effectués en parallèle, on constate que les taux de récupération des anthocyanes sont voisins de 25-26 p. 100. Les écarts sont peu significatifs si l'on tient compte d'une petite différence sur les durées de macération (8 jours et 9 jours).

Toutefois on remarque que l'augmentation de + 1° d'alcool, par addition de sucre, ne paraît pas modifier sensiblement la couleur du vin. Par contre, la dilution du moût, avec de l'eau, correspondant à — 1° d'alcool, entraîne une baisse notable de coloration (27 contre 29 U.D.O.), de l'ordre de 7 p. 100 par rapport au témoin.

La composition du moût conditionnerait-elle la richesse du vin en polyphénols, compte tenu de ce que les éléments solides du raisin introduits sont identiques dans les trois essais de vinification ? Influence de l'acidité, par exemple ?

— *L'influence de la température de vinification* apparaît plus nette. Le gain de 2 à 3 p. 100 sur la récupération des colorants rouges de la vendange se traduit par une augmentation très sensible de la couleur du vin de l'ordre de 8 p. 100 entre les deux températures de vinification de 25° et 35°.

— *La macération carbonique* donne des vins plus colorés et l'on rejoint les conclusions données sur ce type de vinification par BÉNARD et JOURET (1963), dans une expérimentation à l'échelle industrielle.

2° *Vinification en cuve de 110 hectolitres* (tabl. 2).

Dans le cas des vins de la parcelle 1049 C, en expérimentation à l'échelle de la cuve de 110 hectolitres, on observe l'influence très nette de la durée de cuvaison sur l'augmentation de la couleur ; ce facteur macération est bien connu (fig. 1).

Le taux de transposition des matières colorantes est ici au 6e jour de cuvaison de 20 p. 100, ce qui est un taux plus faible que celui observé en microvinification, 26,6 p. 100 (tabl. 1), mais avec une macération légèrement plus longue (8 jours).

Ceci appelle plusieurs remarques. D'abord que l'extrapolation des résultats de la vinification de laboratoire à la cuve industrielle doit être exploitée avec quelque réserve (Flanzy et Poux, 1958). Ensuite, que si la température peut être maintenue à peu près constante dans une microvinification, il n'en est pas du tout de même dans une cuve classique de la pratique, où la température présente une variation continue tout le long de la fermentation ; partant du niveau de la température du raisin(16°), celle-ci s'élève jusqu'à un maximum (ici 32°) pour redescendre ensuite. Enfin, en microvinification le chapeau de marc a été maintenu continuellement immergé par le dispositif expérimental, alors qu'en grande cuve une partie de ce chapeau flotte au-dessus du niveau du liquide.

L'examen de ces facteurs peut expliquer partiellement la valeur plus faible du taux de transposition des matières colorantes dans la cuve de 110 hl, mais la raison la plus importante est certainement la richesse potentielle de chaque vendange. En effet, on a vu précédemment dans la partie expérimentale, que les deux parcelles diffèrent très sensiblement par ce facteur. Si on fait donc abstraction des facteurs technologiques, on constate que les raisins les plus colorés (groupes II et III de la parcelle B_2) donnent aussi les vins les plus colorés (essais en bonbonnes).

En outre, les valeurs rapportées ne traduisent qu'un indice global de composés anthocyaniques, mais ne donnent pas la part respective des diverses formes et de la nature des pigments rouges : aglycones, glucosides, groupes acylés, polymères par exemple. On peut supposer que, pour certaines de ces formes de pigments, la différence entre deux matières premières est importante et peut se traduire par des écarts encore plus notables sur les vins. Interviendrait ici le rôle de ces « facteurs qualitatifs » spécifiques des colorants de chaque vendange. On pose ainsi le problème du dosage individuel et de l'évolution des différents pigments anthocyaniques du raisin au vin.

3° *Autres facteurs intervenant dans le taux de récupération des colorants dans le vin.*

La précipitation des matières colorantes rouges au cours de la conservation des vins est une donnée expérimentale connue, qui peut expliquer en partie les faibles rendements d'extraction entre la matière première et le produit fini. Valuiko (1966) signale un taux de récupération des colorants dans le vin de 50 p. 100 et trouve 50 p. 100 de perte après 3 mois de vieillissement des vins jeunes.

Toutefois, une expérimentation, non encore publiée, de l'un d'entre nous (Aubert) a montré que la perte principale s'effectue au niveau du vin. Ainsi, après fermentation d'un lot de baies dont on a déterminé le potentiel de coloration, on a trouvé 70 p. 100 de colorants dans le vin immédiatement après pressurage et 20 p. 100 de colorants dans le marc frais correspondant. Mais après 10 jours de conservation le vin avait évolué et ne représentait plus que 45 p. 100 du potentiel du raisin.

Cette observation nous conduit à envisager un bilan de ces matières colorantes au cours de la vinification, en tenant compte de leur répartition entre le vin et ses sous-produits, ainsi que de leurs transformations éventuelles.

b) *Sur les matières tannoïdes.*

L'influence des facteurs technologiques est encore plus difficile à préciser sur les taux de récupération des matières tannoïdes, compte tenu de leur difficulté d'extraction totale du raisin entier.

1° *Dans le cas des vins de la parcelle* B_2 (tabl. 3).

— *Influence de l'éraflage :* On constate que les taux de transposition sont de l'ordre de 31,2 p. 100 pour les vins de la vendange éraflée et 41,8 p. 100 pour les vins de la vendange entière sur les bilans de la baie seule, sans la rafle. La comparaison entre les valeurs absolues sur les deux types de vins (33,5 et 44,8 $\times$ 10^3 unités de D.O.) montre que la rafle apporte environ le 1/4 des matières tannoïdes des vins de la vendange entière. Si on admet cette donnée, on peut calculer, par extrapolation, un bilan théorique sur le raisin entier non éraflé. Les bilans en tannoïdes, établis sur les baies, peuvent ainsi être majorés du 1/4 de la valeur donnée par notre technique d'extraction. Ainsi dans le cas des raisins de la parcelle B_2, le bilan en tannoïdes de cette vendange devrait être de l'ordre de $134 \cdot 10^3$ (U.D.O.) au lieu de $107,15 \cdot 10^3$ (U.D.O.) sur les baies sans la rafle ; les taux varieraient ainsi entre 25 et 40 p. 100.

Or, l'extraction des rafles à l'aide des solvants utilisés nous a montré seulement un gain possible de $8,8 \cdot 10^3$ U.D.O., qui ajouté au bilan sur baies de $107,15 \cdot 10^3$ donnerait $115,85 \cdot 10^3$ U.D.O. ; les taux varient alors entre 28,8 et 46,3 p. 100.

Tout se passe donc comme si le vin avait extrait plus de tannoïdes que le milieu artificiel alcoolique utilisé. Un milieu aqueux aurait vraisemblablement entraîné la dissolution de composés tannoïdes d'une forme différente (leucoanthocyanes).

— *L'influence de la température* de vinification se répercute très sensiblement sur les niveaux des matières tannoïdes des vins finis. A une élévation de la température de cuvaison (25 à 35°C) correspond une augmentation relative sur les vins de 10 à 12 p. 100.

— *L'influence du degré alcoolique* est, comme pour les colorants anthocyaniques, essentiellement liée à la composition du moût. En effet, l'addition de saccharose pour obtenir + 1° d'alcool ne modifie pas sensiblement la richesse du vin en polyphénols (45,0 U.D.O. contre 44,8 pour le témoin). Par contre, la dilution du moût avec de l'eau pour diminuer le degré alcoolique de — 1° d'alcool entraîne une perte de l'ordre de 4 à 5 p. 100 en tannoïdes (42,75 contre 44,8).

Tout se passe comme s'il y avait un seuil de dissolution des polyphénols, fonction de la qualité des moûts ; on peut penser à l'acidité ? C'est là un nouveau facteur que nous n'avons pas considéré dans cette étude. Il semble toutefois que ce facteur ne peut être prépondérant que pour des durées de macération suffisantes et en présence de tous les constituants solides du raisin pendant la vinification.

2° *Dans le cas des vins de la parcelle 1049 C*, c'est-à-dire les conditions de la grande pratique (tabl. 4), on voit que le taux de transposition des polyphénols du raisin au vin est essentiellement fonction de la durée de macération (fig. 1).

L'influence de la rafle est difficile à estimer en l'absence d'une expérimentation en vendage éraflée, mais on peut penser qu'elle est vraisemblablement du même ordre de grandeur que pour la vinification en bonbonnes. Cette expérimentation montre que le taux de récupération des matières tannoïdes totales est inférieur à 30 p. 100 pour un vin après 6 jours de cuvaison, en tenant compte du bilan sur la rafle ($125,3 \cdot 10^3$ U.D.O.).

En conclusion, d'une façon très générale, sur l'ensemble des essais réalisés en bonbonne ou en cuve, on peut estimer un taux de transposition des tannoïdes du raisin au vin toujours inférieur à 35 p. 100 pour des macérations de l'ordre de 8 jours à 25°C et de 37 p. 100 pour les vinifications à 35°C. Dans le cas de la macération carbonique, ce taux atteindrait 40 à 43 p. 100, compte tenu de l'apport de la rafle.

C. — *Variations qualitatives des vins en fonction de la vendange*

La technique simple d'extraction du raisin proposée dans notre premier mémoire permet de connaître la teneur potentielle d'une vendange en colorants, et aussi d'estimer, dans les mêmes extraits, la richesse relative en « tannoïdes » ou polyphénols totaux.

Dans un autre travail (Poux et Aubert, 1969), on a montré que les vins diffèrent sensiblement par le rapport entre ces deux types de constituants en fonction des conditions de l'année, c'est-à-dire de la constitution de la vendange.

La connaissance de la composition du raisin en polyphénols peut conditionner les techniques de vinification dans un sens souhaité, soit quantitativement, soit qualitativement. Très sommairement, on peut dire que l'on recherche souvent pour les vins rouges (jeunes) une couleur assez forte et une teneur faible en polyphénols totaux, en partie responsables d'une astringence trop marquée.

C'est ainsi que sur le plan variations qualitatives de la composition des vins, le rapport entre indice de matières colorantes rouges (545 nm) sur l'indice de matières tannoïdes (280 nm), nous a paru intéressant à étudier entre les vins des deux parcelles ; ce rapport nous renseignera sur les variations relatives en ces deux types de constituants polyphénoliques.

Pour les vins provenant de la parcelle B_2 (tabl. 3) ce rapport varie entre 0,62 (vendange entière à 35°) et 0,87 (vendange éraflée à 25°), en fonction du type de vinification ; le vin rosé sans macération présente la valeur de 0,22. Pour les vins provenant de la parcelle 1049 C (tabl. 4) ce rapport croît de 0,23 à 0,49 avec la durée de macération. Lorsque le rapport précédent est élevé, cela peut correspondre dans la pratique à des vins fortement colorés avec une astringence relativement faible, si l'on admet que l'indice de tannoïde est grossièrement représentatif de cette propriété gustative des vins. On peut supposer une certaine corrélation entre la sensation d'astringence et une fraction de ces composés phénoliques.

Effectivement, à couleur égale (28,5 et 29,0 unités de D.O.) les vins de presse de la parcelle 1049 C sont beaucoup plus astringents que les vins provenant de la parcelle B_2.

D'autre part, une macération prolongée en cuve, jusqu'au 6e jour, montre une notation croissante dans la qualité gustative des vins correspondants et parallèle à l'indice de composition ; ceci laisse penser que l'enrichissement en polyphénols est sélectif ou compensé par d'autres facteurs conditionnant la saveur ou « l'harmonie » du vin.

Les vins rouges les plus « équilibrés », à l'état jeune, devraient être les vins de vendange éraflée et de macération carbonique (rapport 0,87 et 0,75) ; ce sont effectivement les plus harmonieux sur le plan gustatif.

D'une façon très générale, les vins de la parcelle B_2 sont supérieurs à ceux de la parcelle 1049 C ; la dégustation est toujours favorable aux premiers, bien qu'il soit admis généralement qu'une macération plus longue donne des vins plus astringents.

On a vérifié si cette tendance était prévisible sur la matière première, c'est-à-dire sur les extraits réalisés par notre technique. En effet, dans le cas des raisins de la parcelle B_2, le rapport des bilans totaux sur la baie (pellicules + pulpe + pépins) :

$$\frac{\text{anthocyanes}}{\text{tannïodes}} \text{ est égal à } \frac{109{,}0 \times 10^3}{107{,}15 \times 10^3} = 1{,}02 ;$$

dans le cas des raisins de la parcelle 1049 C dans les mêmes conditions d'extraction, on trouve :

$$\frac{\text{anthocyanes}}{\text{tannoïdes}} = \frac{88{,}0 \times 10^3}{116{,}5 \times 10^3} = 0{,}755$$

Ces deux rapports nettement différents montrent que la vendange de la parcelle B_2 laisse espérer une richesse relative en colorants, alors que celle de la parcelle 1049 C contient plus de tannoïdes ou polyphénols totaux. Les vins correspondants ont évolué dans le même sens, malgré un taux de transposition très limité (environ 35 p. 100) du raisin au vin fini. La technique d'extraction partielle expérimentée offre donc un moyen de prévision qui devra être vérifié sur une expérimentation beaucoup plus étendue.

CONCLUSION

Au cours d'un travail antérieur (POUX et AUBERT, 1968), on a pu montrer sur neuf années consécutives que la composition en substances polyphénoliques des vins provenant d'un même cépage et issus d'une même parcelle, était essentiellement fonction de la qualité de la matière première de l'année. L'estimation du potentiel polyphénolique d'une vendange déterminée a fait l'objet de la première partie de ce nouveau travail, la tentative d'apprécier par des bilans d'extraction ces matières polyphénoliques au cours de la transformation du raisin en vin était la suite logique de ces recherches.

Jusqu'à présent, en raison des difficultés que présente ce problème de l'estimation de la matière première, la plupart des chercheurs œnologues se sont limités à étudier les rôles respectifs des différentes parties du raisin sur la composition des vins finis. En effet, il faut bien reconnaître que les résultats pratiques obtenus sur les vins achevés suffisent à rendre compte du rôle des principaux éléments de la vendange qui conditionnent la richesse du vin en polyphénols. Parmi eux, il est facile de dissocier expérimentalement l'influence de la rafle, même au stade industriel. Par contre, dans le cas des pépins et pellicules, il est beaucoup plus malaisé de faire la part respective des tannoïdes de ces deux éléments du raisin. C'est ainsi que les bilans en matières tannoïdes, même partiels, donnés dans notre travail, prennent leur intérêt.

Toutefois, la technique d'extraction que nous avons mise en œuvre n'est qu'une première approche du problème, sur laquelle il apparaît que l'on doive formuler

quelques réserves. Ainsi, les bilans sur les matières colorantes des pellicules et la pulpe nous apparaissent convenablement représentatifs de la matière première, si l'on admet deux hypothèses :

— d'une part, que l'extraction des polyphénols a été totale et, surtout sans transformations sensibles ;

— d'autre part, que les colorants anthocyaniques extraits du raisin par le milieu éthanol chlorhydrique sont bien les mêmes que ceux évalués, dans les mêmes conditions, pour les vins correspondants. Des remarques semblables pourraient être faites pour les matières tannoïdes, l'indice proposé n'est pas parfaitement représentatif de la teneur en composés phénoliques. Néanmoins, sur ces bases, on a pu mettre en relief des variations quantitatives et qualitatives de la matière première.

Les taux de transposition des composés anthocyaniques et tannoïdes du raisin au vin sont, de façon très générale, nettement inférieurs à 40 p. 100 dans notre expérimentation. Les vins rouges de macération ordinaire contiendraient de 15 à 35 p. 100 du potentiel de la vendange de *Carignan noir*. Ce faible taux de récupération ne peut être attribué à des conditions de vinification exceptionnelles. Dans cette limite, les variations de teneurs en polyphénols sont fonction de façon sensible des divers modes de vinification expérimentés avec divers paramètres : durée de macération, éraflage, richesse alcoolique, température de vinification, macération carbonique.

Sur un plan qualitatif, il apparaît que le rapport des deux indices étudiés (sur un même prélèvement et dans les mêmes conditions de mesure) est grossièrement représentatif de la composition en polyphénols de chaque vendange et également des vins correspondants. Ce travail d'approche met en lumière la nécessité d'apprécier d'une manière de plus en plus complète, avec le développement des méthodes analytiques, ce potentiel des matières polyphénoliques que recèle toute vendange au départ. Avec des méthodes plus spécifiques d'évaluation des divers composés phénoliques, le problème des corrélations entre les qualités organoleptiques et certains éléments de l'analyse pourra être serré de plus près.

Dans cette voie on peut espérer préciser l'intérêt de certaines pratiques œnologiques qui ne tiennent pas suffisamment compte des caractéristiques de chaque vendange. A chaque matière première devraient être adaptées des conditions de vinification particulières en vue d'obtenir une qualité déterminée des vins.

Notre technique d'estimation de la vendange propose un moyen relativement simple de prévision de la qualité d'une récolte, vue sous l'angle des polyphénols, qui peut compléter éventuellement les contrôles classiques de maturité du raisin.

La deuxième partie de notre recherche a montré les essais réalisables, au stade de la vinification expérimentale, permettant d'utiliser au mieux la valeur d'une matière première déterminée pour obtenir un ou plusieurs types de vin sur la base de leur constitution en colorants rouges et en matières tannoïdes totales.

Reçu pour publication en mars 1969.

SUMMARY

EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS
OF GRAPE. II — RATE OF TRANSLOCATION TO THE WINE

A method of total extraction has enabled the evaluation of phenolic compounds (of anthocyanin and tannoïd types), in different vintages of red *Carignan*.

The translocation of these constituents from grape to wine has been studied under different wine-making conditions and, in particular, as a function of following factors : duration and temperature of cuvage, stalk removal, alcohol content, carbonic maceration.

The rates of translocation or transposition of polyphenols from grape to wine are generally low, about 15-40 p. 100, under the most common conditions of wine-making.

RESUMEN

EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA UVA

II. — PORCENTAGE DE PASO EN EL VINO

Un procedimiento de extracción total, relativamente sencillo, ha permitido evaluar la constitución de los compuestos fenólicos, del tipo antocianos y materias tanoides, de diferentes vendimias de *Carignan negra*.

El paso de estos componentes de la uva en el vino ha sido estudiado en distintas condiciones de vinificación y en función de los siguientes factores, en particular : duración y temperatura de encubado, despalillado de la vendimia, contenido alcohólico, maceración carbónica.

El porcentaje de paso o de transposición de los polifenoles de la uva al vino, son reducidos en general, y de un 15 a un 40 p. 100 en las condiciones de vinificación más corrientes y para la cosecha considerada.

En la práctica, la riqueza potencial cuantitativa y cualitativa de una vendimia en compuestos fenólicos deberiá constituir la condición previa de los factores tecnológicos sobre los cuales es posible actuar con miras a la obtención de una mejora controlada de la calidad.

RIASSUNTO

ESTRAZIONE DEI COMPOSTI FENOLICI DELL'UVA

II. — TASSO DI PASSAGIO NEL VINO

Una tecnica d'estrazione totale relativamente semplice ha permesso di valutare la costituzione in composti fenolici, del tipo antociani e materie tannoidi, di diverse vendemmie di *Carignano nero*.

Il passagio di questi costituenti dall'uva al vino é stato studiato in diverse condizioni di vinificazione e più particolarmente, in funzione dei fattori : durata e temperatura di fermentazione, sgranatura della vendemmia, tenore alcoolico, macerazione carbonica.

Il tasso di passagio o di trasposizione dei polifenoli dell'uva nel vino sono in generale deboli e dell'ordine di 15 a 40 p. 100 nelle condizioni di vinificazione più correnti e per la raccolta considerata.

Nella pratica, la ricchezza potenziale e qualitativa d'una vendemmia in composti fenolici dovrebbe condizionare i fattori tecnologici sui quali si puó agire in vista d'un miglioramento controllato della qualita.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AUBERT S., POUX C., 1969. Extraction des composés phénoliques du raisin. I. Technique d'estimation d'une vendange. *Ann. Technol. agric.*, **18**, (2), 93-109.

BÉNARD P., JOURET C., 1963. Essais comparatifs de vinification en rouge. *Ann. Technol. agric.*,**12**, 85-102

FERRÉ L., 1956. Traité d'Oenologie bourguignonne. *Bull. Inst. nat. Appell. Origine, Vins, Eaux de vie.*

FLANZY M., POUX C., 1958. Les possibilités de la microvinification. Application à l'étude de la macération. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 377-401.

NEGRE E., 1942. Les matières tannoïdes et la composition des vins. *Bull. offic. internation. Vigne Vin*, (154), 20-52.

PACOTTET P., 1926. *Vinification*, 5e éd., Baillière, Paris.

Poux C., Aubert S., 1968. Corrélations entre la constitution des vins en composés phénoliques, la température de vinification et les caractéristiques générales de l'année. *Ann. Technol. agric.*, **17**, (4), 229-313.

Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., 1960. *Traité d'Oenologie*, Librairie polytechnique Ch. Béranger 440-445.

Valuiko G. G., 1966. Changements biochimiques et chimiques des pigments dans la production des vins rouges (en russe). *Techn. Pishch. Rast. Proisklozhd.* 72-88 (in C. A., 1967, **67**, 89.736 *y*).

Ventre J., 1931. *Traité de vinification. Les sous-produits de la vigne*. T. III, 15-16, Librairie Coulet, Montpellier.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (2), 129-137.

ÉVALUATION DE LA CHARGE POLLUANTE DES EAUX RÉSIDUAIRES DES DISTILLERIES VINICOLES

J. MOURGUES, J. MAUGENET

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Cette étude préliminaire sur le problème de l'épuration des eaux résiduaires des distilleries vinicoles se limite à l'analyse de la charge polluante globale de quelques échantillons de vinasses et à la détermination des demandes chimique et biochimique d'oxygène des constituants des vinasses. Ces essais sont effectués en vue de déterminer la part respective qui revient à chaque composé et d'orienter les recherches ultérieures.

INTRODUCTION

Dans une précédente mise au point (Mourgues, Maugenet, 1969), nous avions mentionné quelques données relatives à la charge polluante et à la composition des eaux résiduaires des distilleries vinicoles. Le volume de vinasses, rejeté par cette industrie essentiellement saisonnière, est important puisqu'il est pratiquement égal au volume de vin produit. La charge polluante de ces eaux est une des plus élevées des eaux résiduaires des industries alimentaires et agricoles et varie selon la matière première traitée ; c'est ainsi que les vinasses de lies, riches en matières en suspension et en acide tartrique, apparaissent comme les plus polluantes.

Du point de vue composition, les diverses vinasses (vinasses de piquette, de vin ou de lies) renferment en proportions variables les mêmes composés que le vin : glycérol, acides organiques, sucres résiduels, substances polyphénoliques et matières minérales. Il importe de connaître l'oxydabilité chimique et biochimique de chacun de ces composés afin de déterminer le plus dangereux.

Vaughn et March (1956) ont abordé le problème en se basant sur la demande chimique théorique d'oxygène nécessaire pour assurer la combustion complète des

acides organiques, du glucose et des traces d'alcool contenus dans les vinasses. Par la suite, Mac Millan, York et Vaughn (1959), en comparant les demandes chimique et biochimique de mélanges d'eaux d'égout urbaines et de vinasses, ont supposé que les composés polyphénoliques et les matières solides en suspension sont lentement biodégradés.

Le présent mémoire a pour but de faire une étude plus approfondie de l'oxydabilité des divers composants des vinasses en vue d'orienter nos recherches ultérieures sur l'épuration de ces eaux résiduaires.

I. — MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

1. *Matériel utilisé*

Les vinasses centrifugées de piquette, de vin ou de lies proviennent de diverses distilleries de la zone méridionale.

Parmi les corps purs utilisés, le tanin de raisin provient des laboratoires Newmark (Londres). Les composés polyphénoliques d'un vin rouge ont été isolés et purifiés à l'aide du réactif au sulfate acide mercurique selon Flanzy et Aubert (1968).

Afin de voir les interférences possibles des constituants testés, nous avons rassemblé les principaux dans une vinasse synthétique.

2. *Détermination de la demande chimique d'oxygène* (DCO)

En raison de sa commodité, de sa rapidité et de sa reproductibilité, nous avons choisi la méthode de Jeris (1968). Celle-ci est basée sur l'oxydation des composés organiques de l'eau à analyser par le mélange sulfo-phospho-argento-chromique ; l'ensemble est amené à 165°C en 5 minutes et le bichromate en excès est titré par le sel de Mohr en présence d'orthophénanthroline ferreuse comme indicateur.

Parallèlement, nous avons utilisé la méthode d'oxydation au permanganate de potassium décrite par Rodier (1966). Elle consiste à faire agir pendant 4 heures à la température ambiante un excès de permanganate $\frac{N}{80}$ sur l'échantillon à analyser ; on ajoute ensuite un excès de sel de Mohr et on titre en retour par le permanganate.

3. *Détermination de la demande biochimique d'oxygène* (DBO_5)

La DBO_5 par dilution a été déterminée par la méthode standard américaine (1965). Les échantillons sont neutralisés par la soude N, dilués convenablement avec une eau de dilution ensemencée par deux gouttes par litre d'une suspension fraîchement préparée de terreau dans l'eau distillée et contenant divers sels minéraux ainsi qu'un tampon phosphate à pH 7,2 ; le mélange vinasse-eau de dilution est ensuite transvasé dans des erlenmeyers de 100 ml bouché émeri. Le dosage de l'oxygène dissous, au bout de cinq jours d'incubation à 20°C et à l'obscurité, est fait à l'aide d'un analyseur d'oxygène Beckman ; après débouchage du flacon, on introduit rapidement un barreau magnétique puis l'électrode à oxygène qui est maintenue dans le goulot par un bouchon de caoutchouc percé selon son grand axe.

4. *Détermination de la demande d'oxygène par autoxydation* (DAO)

Comme les polyphénols des vinasses sont des corps réducteurs qui consomment de l'oxygène, nous avons voulu voir la part revenant à cette fixation d'oxygène en ajoutant au contenu des fioles d'incubation non ensemencées une substance bactériostatique. Cette substance doit bloquer la fermentation bactérienne et ne pas freiner la réaction d'oxydation. Le chlorure mercurique utilisé couramment pour ce test (Huriet et Rogeon, 1965) ne convient pas, car l'ion mercure réagit sur les polyphénols en donnant des composés insolubles. Nous avons utilisé du fluorure de sodium à la dose de 1 g/litre.

II. — RÉSULTATS

Les valeurs de la DCO et de la DBO_5 de quelques vinasses sont données dans le tableau 1; le tableau 2 indique ces mêmes valeurs pour les principaux constituants, les résultats étant exprimés en g d'oxygène par gramme de produit. Dans le cas des

TABLEAU 1

DCO et DBO_5 de quelques vinasses centrifugées
(en mg d'O_2/l de vinasse)

Type de vinasse	DCO		DBO_5	$\frac{DBO_5}{DCO}$ (Jeris)
	Méthode de Jeris	Méthode de Rodier		
Vinasse piquette .. 1	16 000	4 923	8 554	0,535
Vinasse piquette .. 2	15 116	4 622	7 587	0,502
Vinasse lie 1	20 320	6 157	13 200	0,650
Vinasse lie 2	16 899	6 060	8 604	0,509
Vinasse vin rouge .. 1	28 829	8 420	12 099	0,420
Vinasse vin rouge .. 2	34 944	10 525	19 872	0,569
Vinasse vin rouge .. 3	33 178	10 053	21 003	0,633
Vinasse vin blanc	27 840	6 400	22 938	0,824

TABLEAU 2

DCO et DBO_5 des constituants des vinasses
(Résultats exprimés en g de O_2/g de matière)

Nature du corps	DCO théorique (1)	DCO trouvée		DBO_5 Méthode par dilution	$\frac{DBO_5}{DCO}$ (Jeris)
		Méthode Jeris	Méthode Rodier		
Éthanol	2,087	2,120	0,126	1,367	0,645
Glycérol.....	1,216	1,202	0,088	0,635	0,528
Acide tartrique	0,533	0,508	0,325	0,270	0,531
Acide malique.....	0,716	0,715	0,410	0,500	0,699
Acide lactique.....	1,066	0,971	0,236	0,571	0,588
Acide acétique	1,066	1,033	0,034	0,558	0,540
Acide citrique	0,685	0,697	0,555	0,350	0,502
Glucose	1,064	1,090	0,020	0,750	0,688
Acide gallique	1,021	0,989	0,829	0,515	0,521
Malvoside	1,343	1,278	0,590	0,308	0,241
Malvidol.....	1,483	1,259	—	0,258	0,205
Épicatéchine.....	1,710	1,643	0,998	0,768	0,467
Pyrocatéchol	1,890	1,917	1,237	0,695	0,362
Polyphénols vin rouge	inconnue	1,830	1,045	0,271	0,148
Tanin raisin « Newmark»	inconnue	1,292	0,781	0,071	0,055

(1) Les valeurs de la DCO théorique ont été calculées d'après les formules chimiques des corps utilisés.

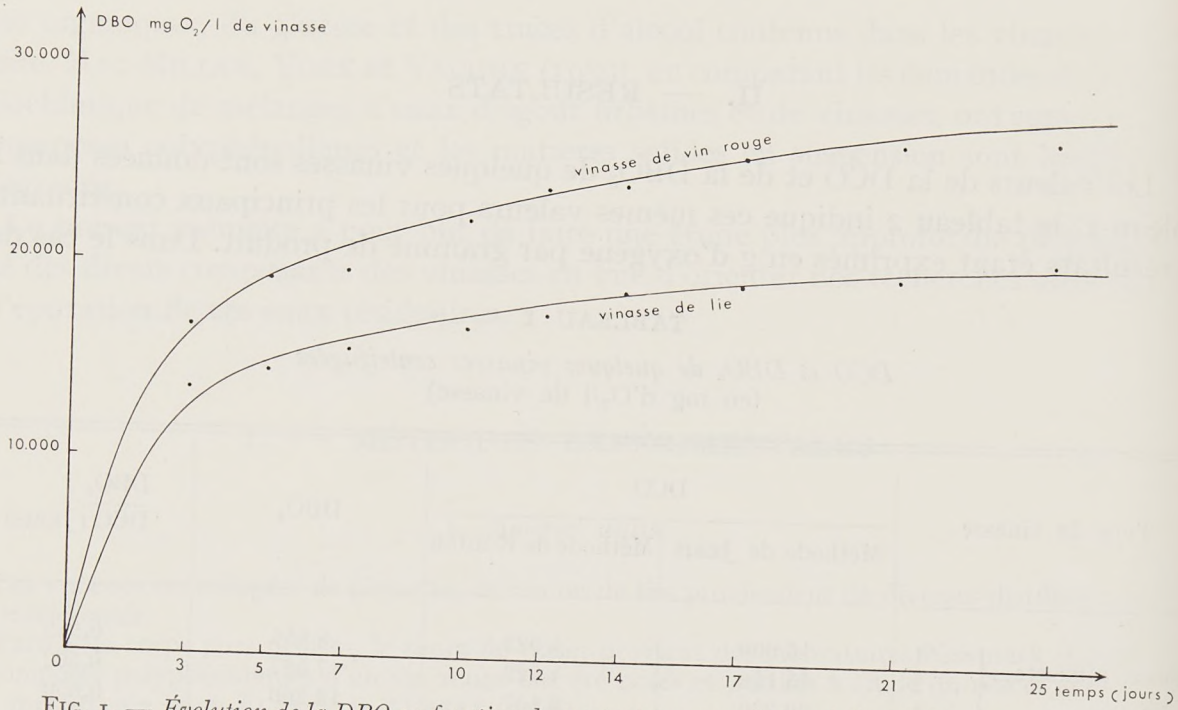


FIG. 1. — *Évolution de la DBO en fonction du temps pour une vinasse de lies* (DCO 25 200 mg O_2/l) *et une vinasse de vin rouge* (DCO 35 500 mg O_2/l)

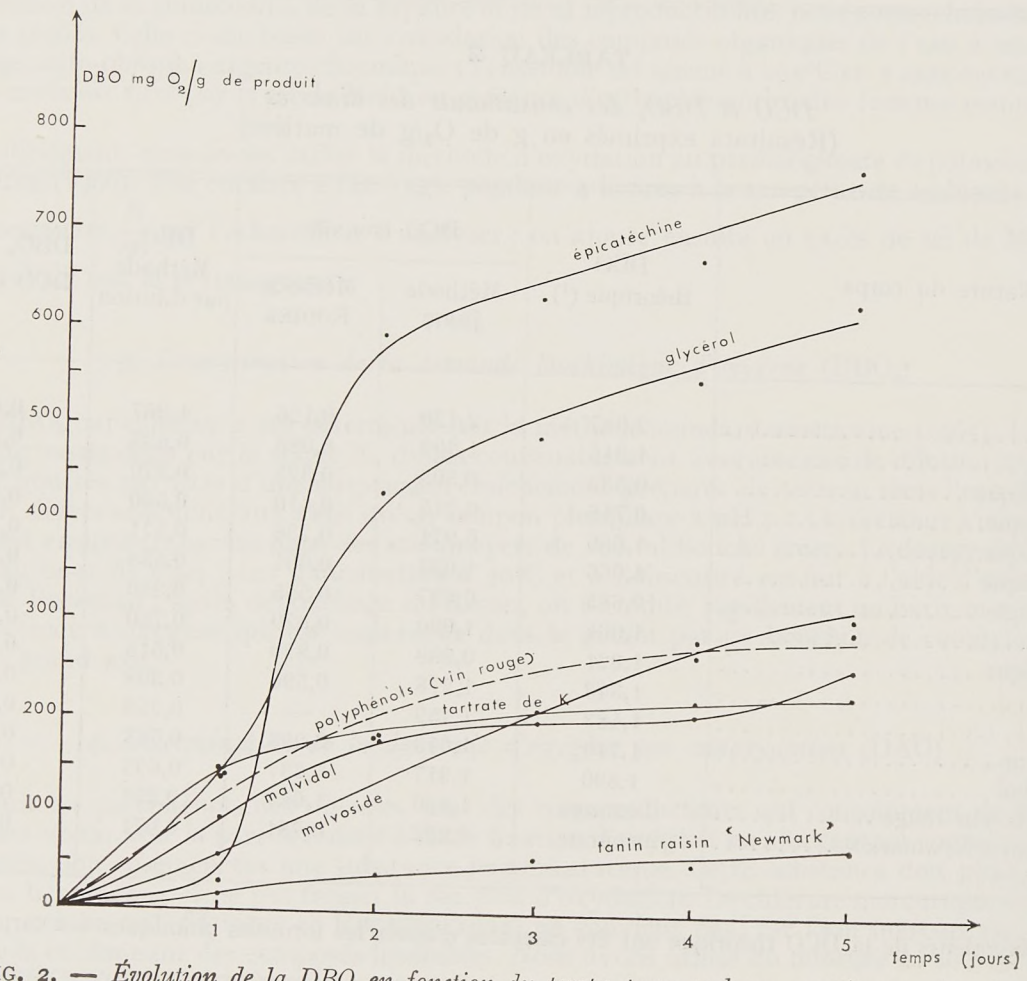


FIG. 2. — *Évolution de la DBO en fonction du temps pour quelques constituants des vinasses*

polyphénols isolés d'un vin rouge, la concentration en ces composés a été déterminée en faisant un extrait sec à 100°C.

Les figures 1 et 2 représentent l'évolution en fonction du temps de la DBO pour une vinasse de lie et de vin ainsi que pour quelques constituants : glycérol, tartrate de potassium, épicatéchine, malvoside, tanin de raisin, polyphénols d'un vin rouge.

Dans le tableau 3, nous avons chiffré la part respective de chaque constituant dans la mesure de la DCO et de la DBO_5 d'une vinasse synthétique.

TABLEAU 3

DCO et DBO_5 d'une vinasse synthétique
(en mg d'O_2/l pour chaque constituant et pour le mélange)

Composé	Poids g/l	DCO Méthode Jeris	(%) du total de la DCO	DBO_5 Méthode par dilution	(%) du total de la DBO_5
Glycérol	8,000	9 543	64,4	5 027	64,2
Acide tartrique	3,000	1 524	10,3	810	10,3
Bitartrate de potassium	3,000	1 230	8,3	756	9,7
Acide lactique	1,000	971	6,6	571	7,3
Acide acétique	1,000	1 033	7,0	558	7,2
Malvidol	0,400	504	3,4	103	1,3
Total		14 805	100,00	7 825	100,00
Valeur trouvée sur le mélange		14 820		7 802	

III. — DISCUSSION ET CONCLUSION

La charge polluante des vinasses testées (tabl. 1) varie selon le type de vinasse ; les charges les plus fortes sont celles des vinasses de vin et les plus faibles celles de vinasses de piquette. L'analyse complète de ces vinasses, qui permettrait d'interpréter ces résultats, n'a pas été faite ; nous donnerons dans de prochains mémoires des bilans analytiques des divers types de vinasse à propos de l'épuration de ces eaux par culture de levure.

Le rapport $\frac{DBO_5}{DCO}$ des vinasses analysées, valable pour le type d'ensemencement utilisé, varie entre 0,420 et 0,824. On remarque que les valeurs de la DCO par la méthode au permanganate à froid sont plus basses que les valeurs de la DBO_5, ce qui nous permet de ne pas conseiller cette méthode.

Les courbes d'évolution de la DBO en fonction du temps pour une vinasse de vin et de lie (fig. 1) sont très voisines ; la consommation d'oxygène est surtout importante dans les cinq premiers jours. Les valeurs de la DBO_5 se rapprochent des valeurs de la DCO (76 p. 100 pour la vinasse de vin et 81 p. 100 pour la vinasse de lie).

Parmi les constituants des vinasses, les traces d'éthanol, le glycérol, les acides

lactique et acétique, et surtout les substances polyphénoliques, ont une forte demande chimique théorique en oxygène, supérieure à 1 gramme d'oxygène par gramme de produit. La valeur de la DCO trouvée par la méthode de JERIS représente 80 à 102 p. 100 des valeurs théoriques ; par contre, la méthode d'oxydation chimique à froid par le permanganate de potassium, donne des résultats très faibles pour le glycérol, l'acide acétique et le glucose, ce qui explique les valeurs très basses trouvées au cours du dosage des vinasses.

Mis à part les polyphénols, tous les composés analysés sont assez bien biodégradés, puisqu'ils ont un rapport $\frac{DBO_5}{DCO}$ supérieur à 0,500. Sur l'acide tartrique, les données bibliographiques manquent, car ce corps est très peu rencontré dans les eaux résiduaires habituellement étudiées ; seuls HEUKELEKIAN et RAND (1955) indiquent, pour l'acide tartrique, une DBO_5 de 0,30 g d'oxygène par gramme de produit. Il faut noter que de nombreuses espèces de bactéries sont capables de métaboliser l'acide tartrique (DUPUY, 1960).

Comme les polyphénols du vin ont des propriétés bactéricides, nous avons opéré par dilutions successives afin d'éliminer le risque d'erreur dû à ce phénomène. Rappelons que les propriétés bactéricides du vin sont attribuées aux aglucones anthocyaniques et notamment au malvidol (MASQUELIER et JENSEN, 1953 ; JENSEN, 1954 ; POWERS et *al.*, 1960), aux acides phénols comme les acides coumarique, caféique et gallique (MASQUELIER et DELAUNAY, 1965) et à certains leucoanthocyanes (SOMAATMADJA, POWERS et WHEELER, 1965). Les polyphénols ayant la plus forte DBO sont l'épicatéchine et l'acide gallique ; par contre, le tanin de raisin analysé consomme très peu d'oxygène même au bout de 10 jours d'incubation.

L'oxygène consommé n'est pas entièrement dû aux fermentations bactériennes puisque la demande d'oxygène par autoxydation représente 27 p. 100 de la DBO_5 pour l'acide gallique, 58 p. 100 pour l'épicatéchine et 70 p. 100 pour les polyphénols du vin.

Le rapport $\frac{DBO_5}{DCO}$ est faible pour le tanin de raisin et pour les polyphénols du vin ; ces corps sont dangereux parce qu'ils sont difficilement dégradables. Une flore adaptée est cependant capable de les métaboliser ; CABRIDENC (1965), BRÉBION, CABRIDENC et HURIET (1967), indiquent que des bactéries appartenant principalement à la famille des *Pseudomonadaceae* dégradent les phénols provenant d'industries diverses telles que cokeries, distilleries de goudron, fabriques de matières plastiques et de matières colorantes.

Le mécanisme de la biodégradation des phénols a été décrit par plusieurs auteurs et notamment par ROGOFF (1961). Il se fait toujours par action successive de divers enzymes (phénolases) facilement induits chez certains microorganismes par des substrats phénolés. Le phénol est, dans un premier temps, oxydé en catéchol, puis une rupture du noyau entraîne la formation d'acide muconique qui, par hydratation, donne de l'acide β-cétoadipique ; ce dernier est ensuite hydrolysé en acides acétique et succinique.

On peut supposer que les polyphénols des vinasses sont métabolisés suivant un processus voisin mais avec des vitesses de dégradation différentes selon leur configuration. CARLES et PECH (1961) ont étudié la dégradation du malvoside : cet hétéro-

side est, dans un premier temps, hydrolysé en glucose et malvidol ; ce dernier donne ensuite de l'acide gallique, de l'acide acétique et du phloroglucinol, les fonctions méthoxyles fournissant, selon leur degré d'oxydation, soit de l'alcool méthylique, soit de l'acide formique, soit encore du gaz carbonique.

Dans le tableau 3 on constate que pour la vinasse étudiée plus de la moitié de la DCO et de la DBO_5 est due au glycérol ; viennent ensuite, par ordre d'importance, l'acide tartrique, l'acide lactique et l'acide acétique qui sont facilement biodégradables. Le malvidol, à la dose retenue, n'a pas inhibé le processus de métabolisation des autres corps. Cependant, comme l'ont signalé Somaatmadja et Powers (1964), les anthocyanes (hétérosides et aglucones) peuvent inhiber l'oxydation du glucose par certaines bactéries.

De tout ceci, il résulte que l'on a intérêt à rejeter des eaux épurées de polyphénols, car ces corps et leurs produits de dégradation peuvent persister longtemps dans les milieux récepteurs qui ne peuvent avoir une flore adaptée, du fait de l'activité saisonnière des distilleries vinicoles. En outre, on connaît peu la toxicité de ces composés vis-à-vis des poissons comparativement à celle du phénol (Cabridenc, 1965, le signale comme dangereux à partir de 1 mg par litre). Flanzy (1936) constate que les vinasses de vin, même diluées 1 000 fois, entraînent la mort des poissons testés (Sophies) (1), mais cet auteur ne dissocie pas la part qui revient aux polyphénols. Patay et *al.* (1961) indiquent cependant que la dose mortelle, pour un leucocyanidol isolé d'un vin rouge, serait de 20 mg par litre pour les Cyprins dorés.

L'orientation de nos recherches ultérieures tiendra compte des observations portées dans ce mémoire ; il est d'ailleurs possible de sélectionner ou d'adapter des microorganismes (levures, mycélium de champignons supérieurs, algues ou bactéries) capables de métaboliser les substances polyphénoliques. Le glycérol, les acides tartrique et lactique peuvent également servir de substrats carbonés et ceci nous conduira à envisager, soit un traitement par voie microbiologique permettant une production de protéines alimentaires (Flanzy et *al.*, 1967) soit un traitement par boues activées ou lits bactériens venant à la suite d'un traitement chimique de neutralisation-précipitation.

Reçu pour publication en avril 1969.

SUMMARY

ESTIMATION OF THE POLLUTIONAL INDEX OF WINERY DISTILLERY WASTES

The authors' investigations indicate that the COD (a potassium dichromate method) and 5 days BOD (dilution method) values of stillage after centrifuging are respectively about 24 000 and 14 000 p.p.m.

Among their components, traces of ethanol, glycerol, lactic and acetic acids, polyphenols, have a high COD, superior to 1 g of oxygen per g of product ; on the other hand, as far as tartaric acid is concerned, the COD only reaches 0.5. All these compounds are susceptible of being easily biodegraded, except the polyphenols ; as the latter remain a long time amidst the receiving areas, it is advisable to eliminate them before their throwing out, either by a chemical precipitation or a treatment with an appropriate microbial flora.

(1) Nom languedocien de la vaudoise (*Squalius leuciscus*).

RESUMEN

EVALUACIÓN DE LA CARGA CONTAMINANTE DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LAS DISTILERIAS VINICOLAS

Los residuos de las destilerías vinícolas analizados presentan una carga contaminante elevada: los valores de promedio de la DCO (método por el bicromato de potasio) y de la DBO_5 (método por dilución) son, respectivamente, de 24.000 y 14.000 mg de oxígeno por litro, después de centrifugación.

Entre sus componentes, los vestigios de etanol, glicerol, los ácidos láctico y acético, así como los polifenoles, presentant un fuerte DCO, superior a 1 gramo de oxígeno por gramo de producto. Por el contrario, únicamente se eleva a un 0,5 para el ácido tártrico. Todos estos compuestos son susceptibles de biodegradación, con bastante facilidad, salvo los polifenoles, ya que, dado que estos últimos persisten durante largo tiempo en los medios receptores, es conveniente eliminarlos antes de la evacuación, ya sea por precipitación química o bien, por tratamiento mediante una flora microbiana adaptada.

RIASSUNTO

VALUTAZIONE DEL CARICO INQUINANTE DELLE ACQUE DELLE DISTILLERIE VINICOLE

Le vinace delle distillerie vinicole analizzate hanno una carica inquinante elevata : i valori medi della DCO (metodo al bicromato di potassio) e della DBO_5 (metodo per diluizione) sono rispettivamente di 240ooe 2 14 000 mg d'ossigeno per litro dopo centrifugazione.

Fra i loro costituenti, le tracce di etanolo, il glicerolo gli acidi lattico ed acetico, i polifenoli, hanno una forte DCO superiore ad 1 grammo d'ossigeno per grammo di prodotto ; per contro, essa non e che di 0,5 per l'acido tartrico ; Tutti questi composti sono suscettibili d'essere biodegradati abbastanza facilmente ad eccezione dei polifenoli ; siccome questi ultimi persistono per lungotempo nei mezzi ricevitori, conviene di eliminarli prima del rigetto, sia per precipitazione chimica sia per trattamento con l'aiuto d'una flora microbica adatta.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Brébion G., Cabridenc R., Huriet B., 1967. Étude des possibilités de biodégradation des effluents industriels. Application à la biodégradation des phénols. *Rev. Inst. fr. Pétrole* ; **23**, 1029-1052.

Cabridenc R., 1965. Métabolisation du phénol et des produits phénoliques in : *La pollution des eaux. Quelques problèmes d'actualité.* Édition Eyrolles et Gauthier-Villars, Paris 119-138 (paru en 1966).

Carles J., Pech R., 1960. L'acide gallique et l'acide protocatéchique, produits de dégradation des anthocyanes du vin. *C. R. Acad. Sci.*, **251**, 2764-2766.

Dupuy P., 1960. Le métabolisme de l'acide tartrique. *Ann. Technol. agric.*, 139-184.

Flanzy M., 1936. Les vinasses des distilleries vinicoles. *Rev. Vitic.*, **85**, 21-26, 36-44, 53-58.

Flanzy M., Aubert S., 1968. Méthode de purification de l'ensemble des composés phénoliques du vin. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 93-98.

Flanzy M., Maugenet J., Bénard P., Mourgues J., 1967. Contribution à l'étude du traitement des vinasses des distilleries vinicoles. *C. R. Acad. Agric.*, 1088-1096.

Heukelekian H., Rand M. C., 1955. Biochemical oxygen demand of pure organic compounds. *Sewage Ind. Wastes*, 1040-1053.

Huriet B., Rogeon M., (M^{lle}) 1965. Réflexions sur les méthodes d'estimation de la charge polluante des eaux industrielles in *La pollution des eaux. Quelques problèmes d'actualité.* (Journée de la pollution des eaux Paris avril 1965) Édition Eyrolles et Gauthiers-Villars, 57-54 (paru en 1966).

Jensen H., 1954. *Recherches sur le pouvoir bactéricide des vins rouges.* Thèse, Drouillard, Bordeaux.

JERIS J. S., 1967. A rapid COD test. *Water Wastes engen.*, **4**, 89-91.

MAC MILLAN J. D., YORK G. K., VAUGHN R. H., 1959. BOD vs COD methods for determining brandy stillage purification. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **10**, 199-205.

MASQUELIER J., DELAUNAY D., 1965. Action bactéricide des acides phénols du vin. *Bull. Soc. Pharm.*, Bordeaux, **104**, 152-156.

MASQUELIER J., JENSEN H., 1953. Recherches sur l'action bactéricide des vins rouges. *Bull. Soc. Pharm.* Bordeaux, **91**, 24-29, 105-109.

MOURGUES J., MAUGENET J., 1969. Méthodes d'évaluation et valeurs de la charge polluante des eaux résiduaires des industries alimentaires. *Ann. Technol. agric.* **18**, 45-66.

PATAY R., MASQUELIER J., DANON G., BERNARD J. J., 1961. Sur la toxicité d'un tannoïde extrait des parties ligneuses de la grappe de raisin. *Progr. Médic.*, 183-184.

POWERS J. J., SOMAATMADJA D., PRATT D. E., HAMDY M. K., 1960. Action of anthocyanin pigments and related compounds on the growth of certain microorganisms. *Food Technol.*, **14**, 626-632.

RODIER J., 1966. *L'analyse chimique et physico-chimique de l'eau ; eau naturelle, eau usée.* 3e édition Dunod, Paris, 324-325.

ROGOFF M. H., 1961. Oxidation of aromatic compounds by bacteria in : *Adv. appl. Microbiol.*, III, 193-219.

SOMAATMADJA D., POWERS J. J., 1964. The influence of anthocyanins and related compounds on glucose oxidation by bacteria. *J. Food Sci.*, **29**, 644-654.

SOMAATMADJA D., POWERS J. J., WHEELER R., 1965. Action of leucoanthocyanins of *Cabernet* grapes on reproduction and respiration of certain bacteria. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **16**, 54-61.

Standard methods for estimation of water and waste water. 12th ed, New York, American Public Health Ann. Inc., 1965, 410-424.

VAUGHN R. H., MARSH G. L., 1956. Problems in disposal of California winery wastes. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **6**, 26-34.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (2), 139-142.

NOTE TECHNIQUE

DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES ACIDES PROPIONIQUE ET BUTYRIQUE DANS LE GRUYÈRE DE COMTÉ ET L'EMMENTAL

J. ANTONINI, J. ADDA

Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

On prépare une méthode de chromatographie en couche mince pour rechercher l'acide butyrique dans le Gruyère de Comté et l'Emmental. Cette méthode rapide permet de mettre en évidence l'origine des défauts d'ouverture de ces fromages.

INTRODUCTION

L'utilisation en fromagerie de laits d'animaux nourris avec de l'ensilage conduit souvent à des gonflements dus à la présence de spores « butyriques ». Outre la perte économique que peut entraîner l'éclatement du fromage, cet accident de fermentation occasionne des défauts organoleptiques, « goût butyrique », et des défauts d'ouverture qui déprécient la qualité de la production.

Des travaux avaient été entrepris à la Station pour étudier les différents moyens propres à éviter le développement de cette fermentation. Il fallait, d'autre part, mettre au point une méthode rapide et simple de détection. Nous avons pensé pouvoir le faire en dosant l'acide butyrique dont la synthèse est induite dans le fromage par la présence des germes butyriques.

Le dosage des acides carboxyliques libres dans les fromages est possible par chromatographie sur colonne d'acide silicique (HARPER, 1953) ou par distillation à la vapeur, suivie d'une chromatographie en phase gazeuse des acides libérés par acidification des savons (RITTER et HÄNNI, 1960 ; JAGER, 1967).

Ces méthodes, quoique précises, sont longues et ne permettent pas le dosage en série de nombreux

échantillons ; c'est pourquoi il a semblé intéressant d'adapter à la chromatographie en couche mince, qui semblait pouvoir fournir une méthode simple et rapide, la méthode de séparation des acides carboxyliques par chromatographie sur papier, décrite par ROBERTS et BURCEK (1957).

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les acides sont séparés sous forme de leurs sels d'éthylamine, sur plaque de cellulose neutre (20 cm × 20 cm Merck). L'atmosphère de la cuve (23 × 23 × 7,5 cm), sursaturée de solvant butanol saturé d'eau, est rendue alcaline par une solution 0,1 N d'éthylamine.

Le révélateur, rouge de chlorophénol en solution à 0,02 p. 100 dans l'alcool à 95 p. 100, fait apparaître les taches d'acides en violet sur fond jaune.

On pèse 5 g de fromage râpé dans un tube. On ajoute 10 ml d'eau distillée. L'échantillon est mis en fine suspension au moyen d'un Ultra Turrax. On évite tout échauffement du mélange par immersion du tube contenant l'échantillon dans un bécher rempli d'eau glacée. Le mélange est filtré sur filtre Durieux 2 B après avoir été amené à un pH inférieur à 2 par addition d'acide sulfurique à 10 p. 100. La liqueur obtenue est amenée à un pH compris entre 8 et 9 par addition d'éthylamine à 33 p. 100, puis refiltrée. Cinq fois 2 microlitres de cette liqueur sont alors déposés sur la plaque qu'on laisse ensuite sécher à l'air libre (ou 2 mn dans une étuve à 60°C). On laisse développer pendant 2 h. Le front de solvant est alors à 7 cm de la ligne de départ. La plaque est à nouveau séchée, puis révélée par le rouge de chlorophénol.

RÉSULTATS

Calcul des Rf.

Les acides acétique, propionique et butyrique sont bien séparés par cette méthode. Il n'est toutefois pas possible de séparer l'acide formique dont le Rf est très voisin de celui de l'acide acétique. Les Rf des acides purs ont été calculés sur des solutions d'acide à 0,5 p. 100 (en déposant un volume de 2 µl) et comparés à ceux obtenus pour différents échantillons de fromage provenant de la Laiterie expérimentale et dont l'âge variait de 5 (échantillons A et F) à 9 mois (échantillons G et M) (tabl. 1 ; fig. 1).

TABLEAU 1

Mesure des Rf

	Acide acétique	Acide propionique	Acide butyrique
Rf acide pur (1)	0,20 ± 0,01	0,36 ± 0,03	0,51 ± 0,03
Rf mesurés (2)	0,20 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,49 ± 0,01
Rf mesurés (3)	0,20 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,48 ± 0,01

(1) Moyenne de six échantillons.
(2) Moyenne obtenue pour 6 échantillons du même Gruyère de Comté.
(3) Moyenne obtenue pour 5 échantillons différents de Gruyère de Comté.

L'identité des taches a été vérifiée, après récupération par grattage et ré-acidification, par la mesure des temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse. On a choisi les conditions opératoires suivantes :

— Appareil F et M 810 équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme.

— Colonnes d'acier inoxydable de 1,5 m de long et de 0,3 cm de diamètre remplies de Poropak Q 80/100 mesh.

— L'analyse est effectuée à une température de 180°C environ.

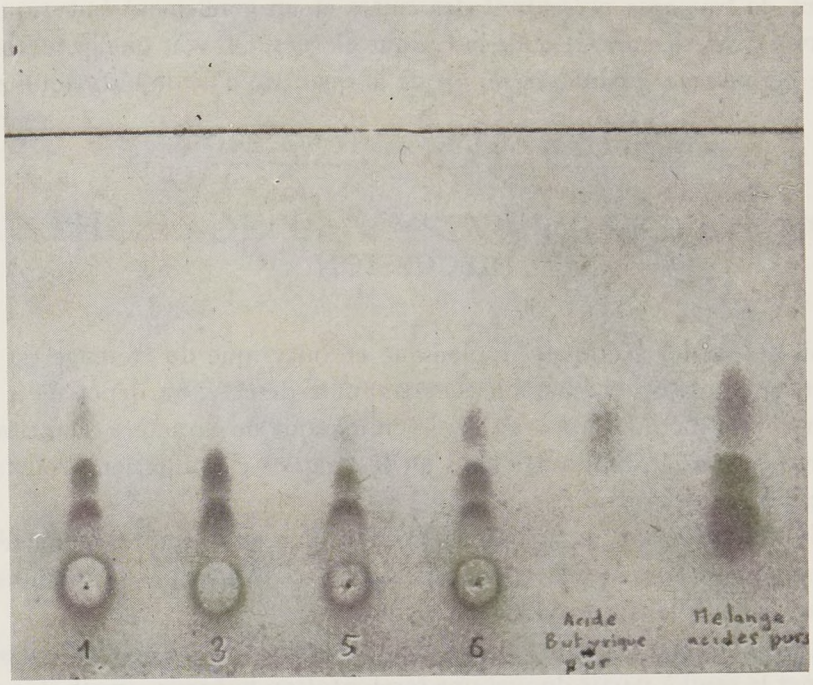


FIG. 1.

Comparaison avec la méthode de HARPER : 8 échantillons ont été analysés par chromatographie sur colonne d'acide silicique d'une part et par la méthode décrite ci-dessus. La figure 2 permet de comparer les résultats.

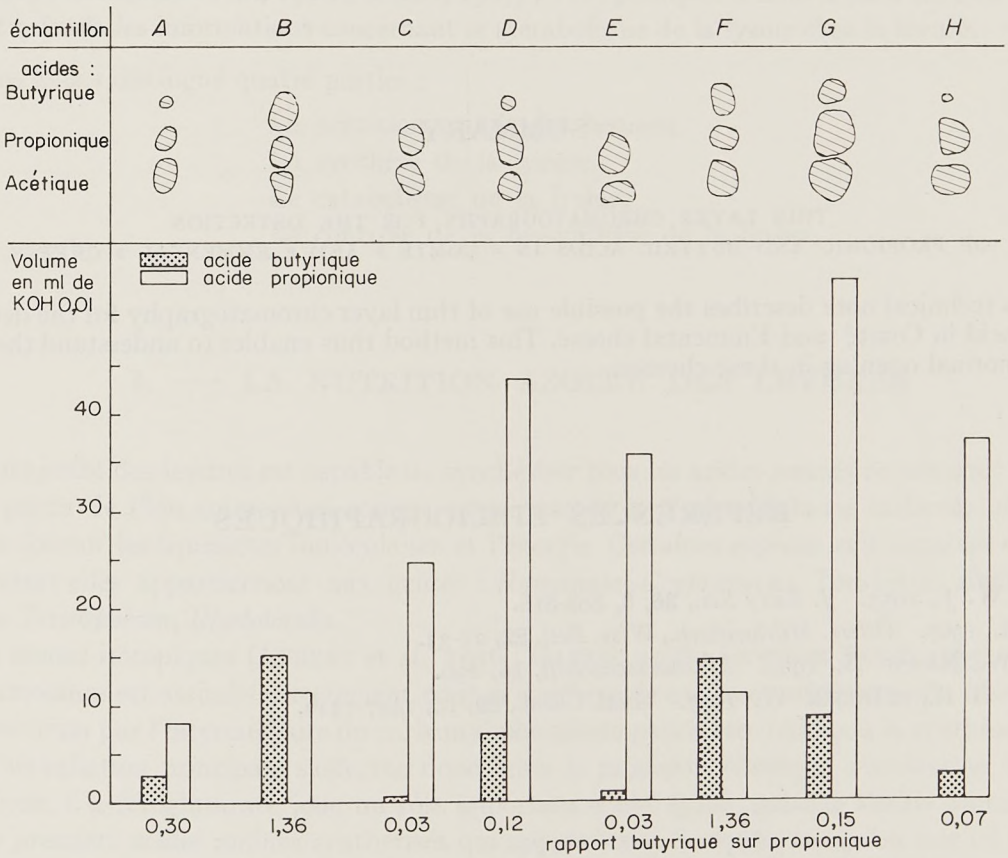


FIG. 2.

En haut de la figure 2, les taches des acides ont été décalquées. En bas le diagramme donne les quantités d'acides butyrique et propionique, dosées par la méthode de HARPER, en ml d'une solution de potasse 0,01 N.

Ainsi l'analyse des échantillons B et F, qui présentent une tache importante d'acide butyrique, et qui provenaient de fromages présentant des cuites et un gonflement butyrique, conduit par la méthode de HARPER à des teneurs en acide butyrique élevées. On voit que la méthode de séparation sur couche mince permet une évaluation rapide de la quantité d'acide butyrique contenue dans un échantillon.

DISCUSSION

La séparation des acides acétique, propionique et butyrique du fromage est satisfaisante. La révélation est nette et la coloration est stable. On peut ainsi détecter un dépôt de 4 µg d'acide butyrique. L'insuffisance de la méthode apparaît dans son manque de caractère quantitatif. Elle ne constitue pas, à proprement parler, un dosage mais un test rapide d'évaluation. Pourtant sa rapidité lui donne, à nos yeux, un intérêt certain.

Il faut 10 minutes environ pour préparer un échantillon et 5 minutes pour déposer un volume de 5 × 2 µl sur une plaque. Le temps de travail effectif n'excède donc pas 15 minutes et il est possible d'analyser plusieurs échantillons sur une même plaque.

Il resterait donc, à l'avenir, à étudier les possibilités d'application de cette méthode et plus spécialement à déterminer le seuil à partir duquel une fermentation butyrique peut être mise en évidence par cette méthode.

Ce travail actuellement en cours fera, nous l'espérons, l'objet d'une prochaine publication.

Reçu pour publication en avril 1969.

SUMMARY

THIN LAYER CHROMATOGRAPHY FOR THE DETECTION
OF PROPIONIC AND BUTYRIC ACIDS IN « COMTÉ » AND « EMMENTAL » CHEESE

This technical note describes the possible use of thin layer chromatography for the detection of butyric acid in Comté and Emmental cheese. This method thus enables to understand the origin of some abnormal opening in these cheeses.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

HARPER W. J., 1953. *J. dairy Sci.*, **36**, 8, 808-816.
JAGER H., 1967. *Österr. Milchwirtsch., Wiss. Beil*, **22**, 25-33.
RITTER W., HÄNNI H., 1960. *Milchwissenschaft*, **15**, 296.
ROBERTS H. R., et BUCEK W., 1957. *Anal. Chem.*, **29**, 10, 1447-1449.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (2), 143-159.

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHÈSE DE LA LYSINE CHEZ LA LEVURE

C. DIVIES

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches de Dijon, 21
Institut national de la Recherche agronomique

Au cours des quinze dernières années, de nombreux travaux ont été effectués pour élucider la synthèse des acides aminés dans les cellules. Malgré les grands progrès qui ont été réalisés par l'étude de mutants et l'emploi des produits marqués, on est obligé de constater qu'il n'existe que des informations fragmentaires lorsqu'on envisage un organisme particulier tel que la levure.

Les dernières mises au point sur le métabolisme des acides aminés sont assez générales (MOAT et *al.*, 1965 ; BROQUIST et *al.*, 1966 ; COHEN, 1967) ; c'est pourquoi il nous a paru utile de rassembler dans cette étude les informations concernant le métabolisme de la lysine chez la levure.

Nous avons distingué quatre parties :

La nutrition azotée des levures;
La synthèse de la lysine;
Le catabolisme de la lysine;
Le contrôle de la biosynthèse de la lysine.

I. — LA NUTRITION AZOTÉE DES LEVURES

La majorité des levures est capable de synthétiser tous les acides aminés requis pour leur croissance à partir de l'ion ammonium comme source azotée et d'une substance carbonée utilisée à la fois pour fournir les squelettes moléculaires et l'énergie. Certaines espèces sont capables d'assimiler les nitrates: elles appartiennent aux genres : *Hansenula, Cryptococcus, Torulopsis, Brettanomyces, Candida, Tricosporum, Rhodotorula.*

Les études isotopiques (AUBERT et *al.*, 1956 ; HARRIS, 1958 ; LEWIS et MOAT, 1965) ont montré que l'ammonium est assimilé directement pour la synthèse de quelques acides aminés. L'assimilation de l'ammonium par l'intermédiaire du carbamyl phosphate paraît être réduite à la synthèse de l'arginine. L'assimilation principale s'effectue donc selon le processus classique d'amination d'un acide α-cétonique. L'α-cétoglutarate joue un rôle important à cet égard, puisque l'acide glutamique est l'un des premiers acides aminés synthétisés qui apparaissent marqués, lorsqu'on met les cellules en présence de $^{15}NH_4^+$ ou d'éthanol uniformément radioactif (SIMS et *al.*, 1964 ; AUBERT et *al.*, 1956)

Ceci est en accord avec les résultats de SUOMALAINEN et *al.* (1963) qui trouvèrent que l'α-cétoglutarate est l'un des acides α-cétoniques importants dans les cellules de levures fermentant le glucose. Outre le glutamate, l'alanine et l'aspartate jouent un rôle important dans la fixation de l'azote ammoniacal (KRETOVICH et *al.*, 1964). L'importance relative de ces différentes voies d'amination est l'objet de controverses.

Si l'on considère le carbone des acides aminés, les études isotopiques ont permis de distinguer six grandes familles d'acides aminés :

1° La famille du glutamate ou de l'α-cétoglutarate : l'acide glutamique, l'arginine, la proline, la lysine.

2° La famille de l'aspartate ou de l'oxalacétate : l'acide aspartique, la thréonine, la méthionine et l'isoleucine.

3° La famille du pyruvate : la valine, l'alanine et la leucine.

4° La famille du phosphoglycérate : la sérine, la glycine et la cystéine.

5° La famille des acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane.

6° L'acide aminé hétérocyclique : l'histidine.

Cette classification a permis de mieux comprendre l'assimilation particulière de certains acides aminés en milieu complexe et les phénomènes de régulation observés.

On sait depuis les travaux de THORNE (1941) que de nombreux acides aminés peuvent servir de source d'azote pour la croissance de *S. cerevisiae*. Ceci souligne l'importance des réactions d'échanges qui peuvent exister chez les levures.

La lysine, qui est un des acides aminés synthétisés en quantité importante par la levure, puisqu'elle représente 6,39 à 9,07 p. 100 de l'azote total (EDDY, 1958), peut servir aussi de source d'azote pour la plupart des levures. Certaines espèces du genre *Saccharomyces* ne sont pas capables de l'utiliser comme unique source d'azote (WALTERS et *al.* 1953). Par contre LA RUE et *al.* (1968) ont récemment montré que d'autres espèces telles que *S. fragilis* peuvent utiliser la L-lysine et la D-lysine et que les levures du genre *Saccharomyces* poussant sur la lysine se multiplient aussi sur les amines et les acides aminés sous forme D.

Les levures comme les microorganismes Gram positifs contiennent de grandes quantités d'acides aminés aisément extractibles (GALE, 1947 ; TAYLOR, 1947). Ce « *pool* » ou réservoir, qui est particulièrement important : 15 à 20 p. 100 de l'azote total (EDDY, 1958), peut servir de source d'acides aminés pour la synthèse des enzymes induits (HALVORSON et SPIEGELMANN, 1953 *a*, *b*). Ces acides aminés ainsi retenus par les cellules peuvent être répartis soit en acides aminés faisant partie du réservoir de concentration, soit en acides aminés faisant partie du réservoir interne (HALVORSON et COWIE, 1961). Ces deux parties du « pool » semblent fonctionnellement et physiquement séparées.

Généralement la lysine est également répartie entre le « *pool* » et les protéines (EDDY, 1958). Elle est fortement consommée dans un milieu riche en acides aminés (BARTON-WRIGHT et *al.*, 1949). Sa consommation représente alors 10 p. 100 de l'azote assimilé, elle suit immédiatement l'arginine qui en représente 35 p. 100. Aussi, la teneur en lysine du « *pool* » varie dans de grandes proportions suivant le milieu de culture : de 9 μM par gramme de poids sec pour des levures cultivées dans un milieu synthétique à 450 μM pour des levures cultivées dans un milieu à base d'hydrolysat de caséine (TAYLOR, 1949). Sachant que 1 mg de poids sec équivaut à 2 μl de volume cellulaire interne (ROBICHON-SZULMAJSTER, 1961), la concentration interne de lysine peut varier de 0,0045 à 0,225 M. Nous verrons par la suite qu'il a été possible d'obtenir des cellules de levures contenant 16,5 p. 100 de lysine par rapport au poids sec (JENSEN et *al.*, 1960) ce qui représente une concentration interne de 0,45 M. Ces faits tendent à montrer, comme le fait remarquer ROBICHON-SZULMAJSTER (1967) à propos de la thréonine, que le « *pool* » doit être séparé des enzymes de la biosynthèse, puisque ceux-ci ne sont pas inhibés par de telles concentrations *in vivo* et qu'ils le sont *in vitro*.

A la différence des cellules d'*E. coli*, les cellules de *S. cerevisiae* retiennent les acides aminés du « *pool* » lorsqu'on les lave avec de l'eau (HALVORSON et *al.*, 1958 ; SURDIN et *al.*, 1965). C'est ainsi que BROQUIST et *al.* (1960) ont montré que toute la lysine produite par *S. cerevisiae* reste concentrée

dans les cellules et ne diffuse presque pas dans le milieu de culture même lorsque la lysine représente 20 p. 100 du poids sec, soit une concentration de 0,55 M. Une partie seulement du « pool » de concentration est échangeable par les acides aminés externes (HALVORSON et *al.*, 1958), alors que chez *E. coli* on observe un échange total (COHEN et *al.*, 1958). Il semble que *S. cerevisiae* (SURDIN et *al.*, 1965), comme d'ailleurs les champignons (NICHOLAS, 1965) puisse présenter parfois une large spécificité ; dans ce cas, les échanges hétérologues observés sont en faveur de l'utilisation d'un réservoir de concentration unique (SURDIN et *al.*, 1965). Ces résultats sur le « *pool* » de concentration ont été obtenus sur des cellules de levure ne présentant pas un système perméasique de spécificité étroite; c'est pourquoi il serait intéressant d'étudier le « *pool* » de concentration chez une souche de *S. cerevisiae* présentant des systèmes perméasiques plus spécifiques (GRENSON, 1967).

Au sujet de la pénétration de la lysine dans la cellule, SURDIN et *al.* (1965) n'ont pas mis en évidence le système perméasique spécifique de la lysine chez *S. cerevisiae*, car il existe un facteur monogénique faisant varier la capacité de concentrer les acides aminés de 100 fois à 10 fois. Mais GRENSON, (1966 *a*, *b*) en étudiant des mutants obtenus avec des concentrations d'analogues d'acides aminés beaucoup moins élevées, a montré que *S. cerevisiae* possède deux systèmes perméasiques distincts, l'un fonctionnant avec l'arginine et la lysine, l'autre spécifique de la lysine. Récemment PALL (1969) souligna l'importance que l'âge de la culture a sur les systèmes perméasiques de *N. crassa*. Chez les cellules âgées, on ne retrouve plus que le système perméasique présentant une large spécificité. Une telle étude chez la levure expliquerait peut-être les résultats contradictoires que nous venons d'évoquer.

Enfin si, comme nous venons de le voir brièvement, l'entrée des acides aminés commence à être mieux connue, la réaction de sortie, qui ne semble pas être catalysée par le même système que celui de l'entrée (SURDIN et *al.*, 1965), l'est beaucoup moins.

II. — SYNTHÈSE DE LA LYSINE

1. *Mise en évidence de la voie de biosynthèse*

Les études conduites à partir d'acétate marqué ont, tout de suite, montré que l'acétate est incorporé avec une grande efficacité dans la lysine. Si l'on fournit de l'acétate, marqué sur le carboxyle, à une souche de *Torulopsis utilis*, on retrouve un fort marquage sur le carboxyle de la lysine (EHRENSVARD et *al.*, 1951). De même, la lysine est fortement marquée si on fournit de l'acétate marqué sur son groupement méthyl (GILVARG et BLOCH, 1951). Poursuivant ces travaux dans le cas particulier de la lysine, STRASSMANN et WEINHOUSE (1953) ont donné les premiers l'interprétation de leur expérience d'analyse isotopique à partir d'acétate et de glycine marqués chacun en C_1 et C_2, et de lactate et de formiate marqués sur leur carboxyle. Pour cela, ils procèdent à l'analyse des six carbones de la lysine qu'ils dégradent par des méthodes chimiques. Ils constatent que l'acétate est fortement incorporé dans la lysine, mais que la glycine, le lactate et le formiate marqués dans leur carboxyle le sont beaucoup moins (2 p. 100 environ), alors que le groupement méthylène de la glycine l'est beaucoup plus (20 p. 100 environ). L'analyse de la radioactivité montre que le carbone de l'acétate marqué en C_2 se retrouve sur les carbones 2, 3, 4, 5 de la lysine et que le carbone de l'acétate marqué en C_1 est retrouvé sur les carbones C_1 et C_6.

STRASSMANN et WEINHOUSE (1952 *a*, *b*) avaient constaté auparavant que l'acide citrique n'était pas une molécule symétrique pour l'acotinase, ce qui venait confirmer la vérification de MARTINS et *al.* (1960) de l'hypothèse de OGSTON (1948). En effet, si l'on fournissait l'oxalacétate-4-^{14}C, on obtenait l'α-cétoglutarate marqué en 1. Avec l'acétate marqué en C_2, on obtenait l'α-cétoglutarate marqué sur ses quatre premiers carbones. Comparant l'activité de la lysine sur ses carbones 3 et 6 et l'α-cétoglutarate sur ses carbones 2 et 5, STRASSMANN et *al.* (1953) ont pensé que la lysine doit être obtenue par condensation de l'acétate et de l'α-cétoglutarate ; on obtient ainsi un acide en C_7, l'homocitrate

qui, par une série de réactions analogues à celles du cycle de KREBS, donne l'α-cétoadipate (figure 1). Cet acide par amination doit ensuite donner l'α-aminoadipate. Cette hypothèse était plausible, car l'α-aminoadipate était connu comme un précurseur de la lysine chez *N. crassa* (MITCHELL et HOULALAN, 1948).

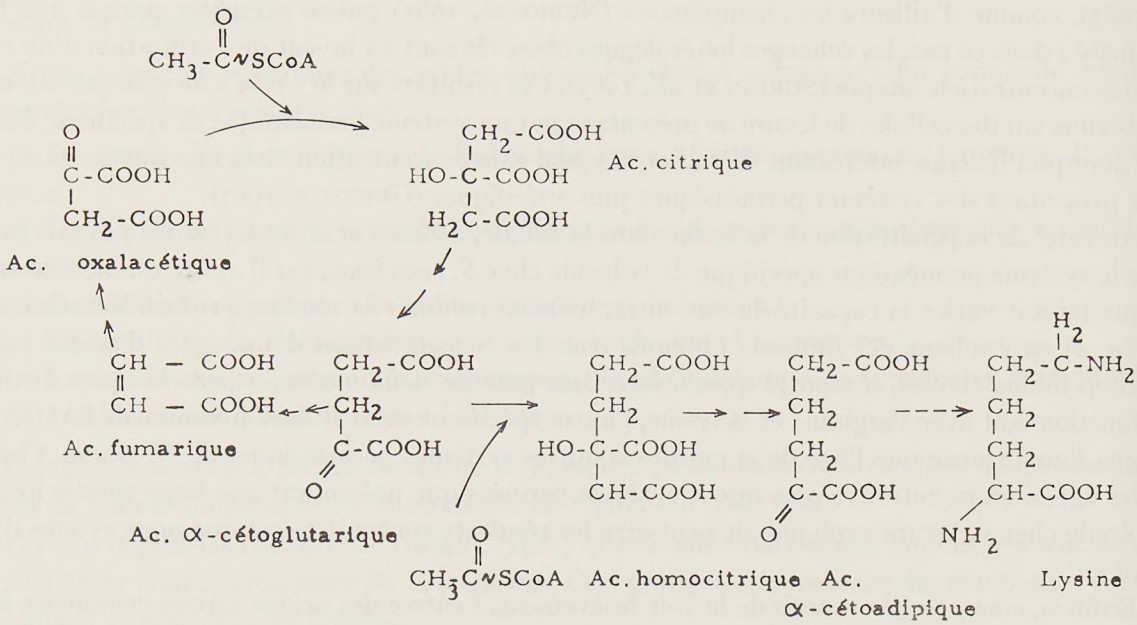


Figure 1. — *Résumé synoptique de l'interprétation d'analyse isotopique de* STRASSMANN et al. (1953)

2. *Condensation de l'acétate et de l'α-cétoglutarate*

La première étape de la synthèse de la lysine a été démontrée plus récemment. STRASSMANN et CECI (1964) ont étudié la formation de l'acide homocitrique à partir d'acétate radioactif marqué en C_1, d'α-cétoglutarate, d'extraits de levures dialysées, de CoA, d'ATP et de Mg^{++}. L'acide homocitrique formé est proportionnel à la quantité d'α-cétoglutarate ajoutée. Il s'agit bien de l'acide homocitrique puisque le Rf de cet acide dans 7 solvants différents est identique à l'acide homocitrique que ces auteurs ont synthétisé. Ainsi l'α-cétoglutarate se condense avec une molécule d'acétyl-CoA pour donner l'acide homocitrique (figure 2). Deux phénomènes ont lieu pendant la réaction : la réaction de condensation proprement dite et l'hydrolyse du thioester.

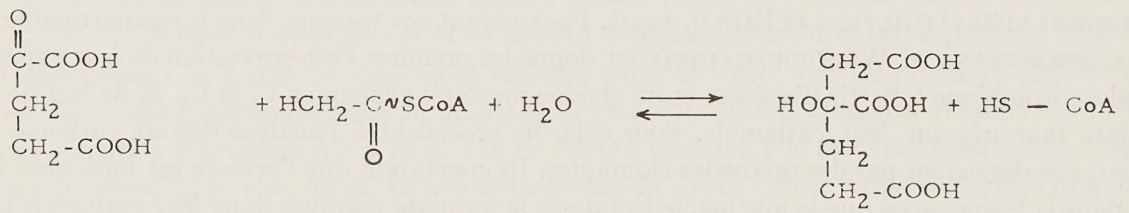


Figure 2. — *Réaction de formation de l'acide homocitrique*

L'enzyme de condensation qui effectue cette réaction est différent de l'enzyme de condensation catalysant la formation du citrate (OCHOA, 1953), de l'α-éthylmalate et de l'α-(*n*-propyl)-malate (STRASSMANN et *al.*, 1967).

L'étude des mutants biochimiques a apporté une nouvelle preuve du rôle de l'acide homocitrique dans la biosynthèse de la lysine, puisque l'on observe son accumulation chez des mutants de levures lysine auxotrophes (MARAGOUDAKIS et *al.*, 1966 *b*). L'acide homocitrique accumulé peut être converti en lysine, mais il faut le noter, avec un faible rendement. HOGG et *al.* (1965) ont montré qu'une souche de *N. crassa*, lysine auxotrophe, accumule aussi de l'homocitrate, ce qui apporte une nouvelle preuve du rôle de cet acide chez *N. crassa*.

3. *La transformation de l'acide homocitrique en acide homoisocitrique*

La transformation de l'homocitrate en *cis*-homoaconitate par déshydratation et sa réhydratation en homoisocitrate a été trouvée par STRASSMANN et *al.* (1965 *a*, *b*). Le mutant Ly_4 de *S. cerevisiae* (MARAGOUDAKIS et *al.*, 1966 *b*) accumule dans le milieu de culture, outre l'acide homocitrique, l'acide *cis*-homoaconitique, ce qui semble indiquer que deux enzymes différents interviennent dans la transformation de l'homocitrate en homoisocitrate. Le mutant ne possède pas de *cis*-homoaconitase (SHEIFINGER et *al.*, 1966 ; MARAGOUDAKIS et *al.*, 1966 *a*) catalysant la réaction entre l'acide homoisocitrique et l'acide *cis*-homoaconitique.

La *cis*-homoaconitase, qui a été partiellement purifiée par traitement à la protamine et précipitation au sulfate d'ammonium, a été facilement séparée de l'aconitase (STRASSMANN et CECI, 1966). Elle ne possède pas d'activité sur le β-isopropylmalate, intermédiaire de la synthèse de la leucine, ce qui souligne sa spécificité. Les Km sont de $2{,}4 \cdot 10^{-4}$M pour l'homoisocitrate et de $1{,}4 \cdot 10^{-4}$M pour le *cis*-homoaconitate. La dialyse pendant quatre heures ne diminue pas beaucoup son activité. Les agents chélateurs tels que l'*o*-phénantroline sont actifs, aussi il est fort possible que l'activité de l'enzyme soit liée à la présence d'un métal. Ce qui paraît surprenant, c'est que les extraits cellulaires ne sont pas capables d'effectuer la réaction de déshydratation entre l'acide homocitrique et l'acide *cis*-homoaconitique (MARAGOUDAKIS, 1967), aussi on peut imaginer qu'il faille activer l'homocitrate avant de le déshydrater.

L'étude du mutant Ly_{12} de *S. cerevisiae* (BATTACHARJEE et STRASSMANN, 1967 *a*), qui n'est pas capable de métaboliser l'acide homoisocitrique, a montré que dans le milieu l'homocitrate est davantage accumulé que le *cis*-homoaconitate, lequel l'est davantage que l'homoisocitrate. Ces données montrent que ces proportions sont différentes de l'équilibre réalisé par l'aconitase, puisque, pour cet enzyme, la quantité d'isocitrate produite est presque le double de la quantité de *cis*-aconitate. On remarque, cependant, que comme pour la réaction catalysée par l'aconitase, la forme β-hydroxyle est en quantité plus importante dans le milieu.

4. *La formation de l'acide α-cétoadipique*

Depuis l'étude de BERGSTROM (1950) on sait que l'acide α-cétoadipique est un précurseur de la lysine. Les extraits de levures non purifiés convertissent l'acétate et l'α-cétoglutarate en acide α-cétoadipique en présence de CoA, de NAD et d'ATP (STRASSMANN et CECI, 1964 *b* ; WEBER et *al.*, 1964). A la différence de la réaction précédente, il semble que l'analogie avec le cycle de KREBS soit beaucoup plus grande et que ce soit un même enzyme qui effectue la réaction de décarboxylation oxydative avec comme intermédiaire vraisemblablement l'acide oxaloglutarique (figure 3). Le fait que l'on n'ait pas isolé de mutants biochimiques accumulant l'oxaloglutarate laisse penser qu'il s'agit bien d'un seul enzyme qui effectue la réaction.

A la différence de l'isocitritase, la substitution de NAD par le NADP diminue beaucoup la vitesse de réaction. De plus, la présence d'AMP, l'activateur allostérique de l'isocitritase n'est pas requise.

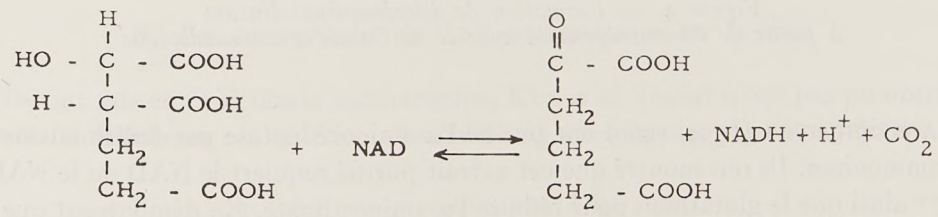


FIGURE 3. — *Réaction de formation de l'acide α-cétoadipique*

5. *La formation de l'acide α-aminoadipique*

Depuis longtemps on suppose que l'acide α-aminoadipique est un métabolite intermédiaire dans la synthèse de la lysine, puisqu'il peut servir de précurseur (MITCHELL et *al.*, 1948). Chez un mutant lysine auxotrophe de *N. crassa*, l'α-aminoadipate marqué est uniquement incorporé dans la lysine (WINDSOR, 1951). SAGISAKA et *al.* (1957) arrivèrent aux mêmes conclusions en montrant, en outre, que les levures accumulent une grande quantité de lysine. Nous reviendrons par la suite sur ce point.

Si la transaminase effectuant la réaction entre l'α-cétoglutarate et l'α-aminoadipate n'a pas été purifiée, on a cependant obtenu cette réaction à partir d'extraits de levure, de glutamate et de pyridoxal phosphate (BROQUIST et *al.*, 1959).

6. *La réduction de l'acide α-aminoadipique*

DEMAIN (1963) montre que les mutants de *Saccharomyces*, à la différence de ceux de *Neurospora*, ne poussent pas sur le milieu contenant l'acide D-α-aminoadipique.

YURA et VOGEL (1957, 1959) ont suggéré, par analogie avec *N. crassa*, que l'acide α-aminoadipique-δ-semialdéhyde devait être un intermédiaire de la synthèse de la lysine chez la levure. Ils avaient été amenés à faire cette hypothèse chez *N. crassa*, car le mutant lysine auxotrophe se développait sur hexahomosérine et possédait une ω-hydroxyméthyl déshydrogénase fonctionnant avec le NAD (BLACK, 1955). On n'avait cependant pas montré que des mutants de levures lysine auxotrophes pouvaient se développer sur hexahomosérine.

La formation d'acide α-aminoadipique-δ-semialdéhyde n'a pu être mise en évidence facilement, car ce composé se cyclise rapidement en acide Δ_1-pipéridéine-6-carboxylique, cependant LARSON et *al.* (1963) y sont parvenus. Ils ont employé pour cela l'o-aminobenzaldéhyde qui forme avec l'anhydride cyclisé de l'acide α-aminoadipique-δ-semialdéhyde un composé coloré, le dihydroquinazolinium facile à doser par colorimétrie (figure 4). Le produit coloré est effectivement radioactif lorsqu'on ajoute l'α-aminoadipate marqué.

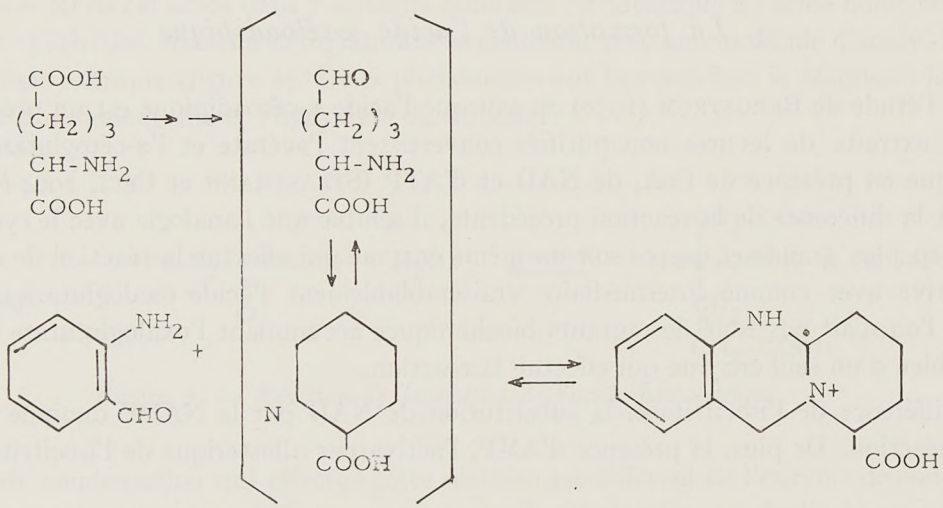


Figure 4. — *Formation de dihydroquinazolinium à partir de l'o-aminobenzaldéhyde et de l'acide α-aminoadipique*

SAGISAKA et SHUMURA (1959, 1960) ont purifié l'α-aminoréductase par fractionnements répétés au sulfate d'ammonium. Ils ont montré que cet extrait purifié requiert le NAD ou le NADP, l'ATP, le cation Mg^{++} ainsi que le glutathion pour réduire l'α-aminoadipate. En démontrant que l'α-aminoréductase effectue l'échange entre le pyrophosphate et l'ATP, ces auteurs pensèrent, par analogie

avec la biosynthèse de l'aspartate semialdéhyde, qu'il devait y avoir activation de l'α-aminoadipate avant sa réduction, d'autant plus que cet échange ne nécessitait pas le glutathion et n'était pas inhibé par l'iodoacétamide comme la réaction globale.

Ainsi donc, il est probable que la réaction a lieu en trois temps :

α-AAA (1) + ATP → α-AAA — AMP + PP

α-AAA — AMP + NADPH + H^+ → α-AAA — H_2 — AMP + NADP

α-AAA — H_2 — AMP + H_2O → α-AAA — δ — semialdéhyde + AMP

Mattoon (1961) a confirmé cette hypothèse, en montrant qu'une levure lysine auxotrophe, qui ne se développe pas dans un milieu contenant l'α-aminoadipate, accumule un composé adénylé, qui par hydrolyse avec HCl 4N donne de l'α-aminoadipate.

7. *La formation de la saccharopine*

On supposait bien que l'acide α-aminoadipique devait être transformé en lysine par une série de réactions analogues à la transformation de l'acide glutamique en ornithine avec passage par la forme semialdéhydique (Harris, 1958). Mais Kuo, Saunders et Broquist (1962) , étudiant la conversion du DL-α-aminoadipate en lysine par des cellules non proliférantes, ont trouvé que l'analogie n'était pas parfaite et qu'il y a un composé stable qui apparaît. La radioactivité se répartit en effet entre la lysine, l'acide D-pipéridone carboxylique et un composé qui s'accumule avant que la lysine ne soit synthétisée. Ils identifièrent ce composé comme étant la saccharopine, qui venait d'être isolée et identifiée chez la levure par Darling et Larsen (1961) et Kjaer et Larsen (1961). Ce composé est la ε-N-(L-glutaryl-2)-L-lysine.

Au cours de la transformation du DL-α-aminoadipate en lysine, l'acide pipéridone-6-carboxylique n'apparaît qu'après la formation de la lysine (Kuo et *al.*, 1964). Par analogie avec la cyclisation du composé D dans la formation de la glutamine (Meister, 1962), on pense donc que l'enzyme activateur n'est pas stéréospécifique et active aussi la forme D de l'α-aminoadipate qui se cyclise en acide D-pipéridone-6-carboxylique. Le D-α-aminoadipate doit, de plus, pénétrer plus lentement dans es cellules.

La formation de la saccharopine a pu être obtenue à partir d'extrait de cellules de levures, de DL-α-aminoadipate, d'ATP, de glutamate et de $NADH_2$ (Kuo et *al.*, 1964) ainsi qu'à partir de l'acide α-aminoadipique-δ-semialdéhyde, de glutamate et de $NADH_2$ (Jones et *al.*, 1961 ; Jones et Broquist, 1963). Récemment, Jones et Broquist (1966) purifièrent la saccharopine réductase qui catalyse la réaction :

$$\text{α-aminoadipique-δ-semialdéhyde} + \text{glutamate} + \text{NADPH} + H^+ \underset{2}{\overset{1}{\rightleftarrows}} \text{saccharopine} + \text{NADP} + H_2O.$$

Le NADH peut effectuer la réaction dans le sens (1) mais avec moins d'efficacité que le NADPH. Par contre, les deux transporteurs, NAD et NADP, sont aussi efficaces pour la réaction (2) qui présente un pH optimum de 9,75 alors que la réaction de formation de la saccharopine s'effectue à un pH optimum voisin de la neutralité. Le poids moléculaire de l'enzyme a été estimé à 72 800. Plus de 95 p. 100 d'inhibition est observé avec le *p*-hydroxymercuribenzoate, ce qui laisse supposer la présence de groupes sulfhydriles. Les constantes de la réaction (2) sont de $9{,}2 \cdot 10^{-4}$M pour la saccharopine et $2{,}2 \cdot 10^{-5}$M pour le $NADP^+$.

8. *La conversion de la saccharopine en lysine*

Lorsqu'ils ont mis en évidence la saccharopine, Kuo *et al.* (1964) n'ont pas pu obtenir la lysine à partir d'extraits cellulaires : la réaction s'arrêtait à la saccharopine. De même Jones *et al.* (1965)

(1) α-AAA = acide α-aminoadipique.
α-AAA-AMP = adényl-α-aminoadipate.

qui ont purifié la saccharopine réductase dans le même précipité que la saccharopine déshydrogénase, ont trouvé beaucoup plus facile d'obtenir la saccharopine à partir de lysine et d'α-cétoglutarate.

SAUNDERS et *al.* (1966) ont donné l'explication en montrant que la formation de lysine à partir de saccharopine pouvait se faire à un pH beaucoup plus alcalin que celui employé précédemment. La saccharopine déshydrogénase effectue donc la réaction :

$$\text{Saccharopine} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrows \text{Lysine} + \alpha\text{-cétoglutarate} + \text{NADH} + \text{H}^+.$$

Les constantes enzymatiques sont respectivement de $1{,}2 \cdot 10^{-2}$M, $4{,}4 \cdot 10^{-4}$M et $4{,}6 \cdot 10^{-5}$M pour la lysine, l'α-cétoglutarate et le NADH, ce qui pourrait expliquer l'accumulation de la lysine à de fortes concentrations dans les cellules de levures.

La saccharopine déshydrogénase présente un poids moléculaire de l'ordre de 49 000. Elle n'est pas capable de scinder le ε-N-méthyllysine, ce qui souligne sa spécificité.

Notons que la réaction de transamination entre l'acide α-aminoadipique-δ-semialdéhyde et le glutamate est très différente d'une réaction de transamination classique puisqu'elle donne un produit intermédiaire stable et qu'elle fait intervenir des pyridines nucléotides à la place du pyridoxal phosphate. Au cours de cette transamination on aurait, d'après SAUNDERS et *al.* (1966), la formation de bases de Schiff (figure 5, II et IV). Nous remarquons, en outre, sur la figure 5, qu'un rapport élevé $\frac{\text{NADPH}}{\text{NADH}}$ est en faveur de la synthèse de la lysine.

Le rôle physiologique exact de la saccharopine est encore mal connu, car si l'on connaît la constante enzymatique de la saccharopine déshydrogénase pour la lysine, on ne connaît pas encore celle de la saccharopine déshydrogénase pour la saccharopine. Le fait que JONES et *al.* (1965) aient obtenu un mutant de *S. cerevisiae*, Ly_1, qui ne possède pas de saccharopine déshydrogénase et qui accumule la saccharopine sans donner de lysine, indique que la saccharopine est un intermédiaire dans la synthèse de la lysine ; est-ce de plus une forme de réserve de la lysine? La question reste encore sans réponse.

Certains auteurs (ASPEN et *al.*, 1962 ; ROTHSTEIN, 1963) avaient suggéré que l'acide α-aminoadipate-δ-semialdéhyde pouvait être aminé et donner la lysine en passant par la forme cyclique notamment chez *Aspergillus nidulans* et *Euglena gracilis*. Ce n'est pas, en tout cas, la seule voie de formation de la lysine, car les organismes étudiés possèdent la saccharopine déshydrogénase (VAUGHAN et *al.*, 1965).

Les étapes biochimiques que nous venons d'examiner auraient pu nous laisser penser que l'α-aminoadipate est un intermédiaire obligatoire dans la synthèse de la lysine. HWANG et *al.* (1966) ont montré par analyse génétique que l'α-aminoadipate était plutôt un précurseur. L'analyse biochimique de cette étude génétique n'a pas été effectuée à notre connaissance. De même, on ne connaît pas le rôle des 14 gènes qui gouvernent la biosynthèse de la lysine chez la levure. On connaît à l'heure actuelle beaucoup moins d'étapes biochimiques.

Le rôle du glutarate dans la biosynthèse de la lysine n'est pas très bien compris. Les levures qui accumulent l'α-aminoadipate (BHATTACHARJEE et *al.*, 1967 *b*) accumulent aussi le glutarate, c'est pourquoi on pensait que l'on avait la réaction : α-cétoadipate + $1/2\ \text{O}_2 \rightarrow$ glutarate + CO_2 (BHATTACHARJEE et *al.*, 1968). Mais BURKE et *al.* (1968) ont montré qu'un mutant de *N. crassa* lysine auxotrophe peut dans certaines conditions utiliser l'acide glutarique comme précurseur de la lysine. La question qui reste encore posée est de connaître la réaction de genèse de la lysine à partir de l'acide glutarique. L'hypothèse que l'on retient est qu'il doit exister chez les levures, comme chez *Penicillium citreo-viride* (TANENBAUM et *al.*, 1964), un enzyme condensant le glyoxylate et le glutarate pour donner l'homoisocitrate ; cette réaction est parfaitement réversible, mais on ne comprend pas pourquoi le mutant 3393 de *N. crassa*, qui accumule l'acide homocitrique et qui peut utiliser l'homoisocitrique (HOGG *et al.*, 1968), ne peut utiliser la glutarate comme précurseur de la lysine.

La genèse de l'α-cétoglutarate qui s'accumule chez les mutants de levure ne produisant pas d'acide homoisocitrique n'est pas très claire (BHATTACHARJEE et *al.*, 1968), puisque ces mutants ne semblent pas différents de la souche sauvage dans la constitution de leur glutamine synthétase et que leur respiration ne paraît pas changée.

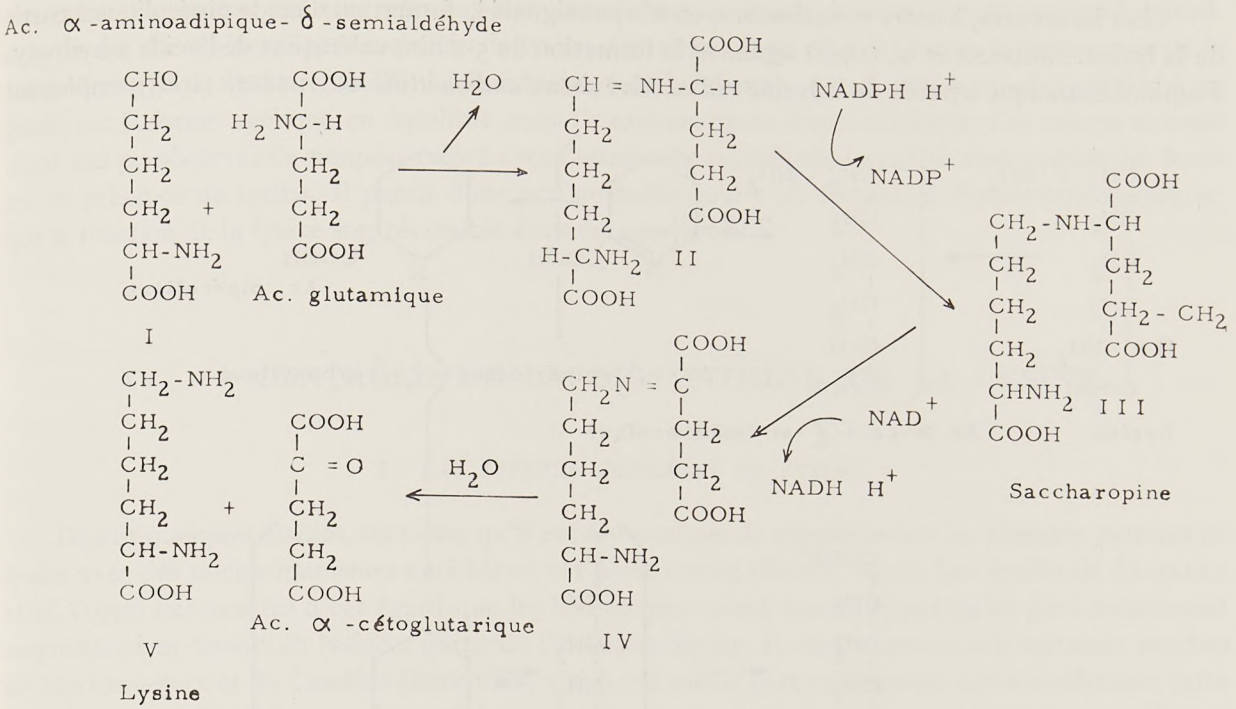


FIGURE 5. — *Réactions de formation de la lysine à partir de l'acide α-aminoadipique-δ-semialdéhyde* (SAUNDERS *et al.* 1966)

III. — CATABOLISME DE LA LYSINE

A la différence de la synthèse, le catabolisme de la lysine n'a pas été étudié de façon intensive chez la levure. La transformation de la lysine en acide pipécolique a été démontrée chez les plantes (GROBBELAAR et *al.*, 1953 ; LOWY, 1953), chez *N. crassa* (SCHWEET et *al.*, 1954) et dans les tissus animaux (ROTHSTEIN et *al.*, 1964).

On n'a pas pu identifier d'intermédiaire entre la lysine et l'acide pipécolique, mais il est probable qu'il y a formation de l'acide α-cétonique qui se cyclise en acide Δ_1-pipéridéine-2-carboxylique, lequel est réduit en acide pipécolique. Cette dernière réaction a été réalisée à partir de tissus animaux, de plantes et de microorganismes (MEISTER et *al.*, 1957 *a* ; MEISTER et *al.*, 1957 *b* ; SCHWEET et *al.*, 1954). ROTHSTEIN et *al.* (1962) ont montré que l'acide pipécolique marqué peut produire l'α-aminoadipate avec un bon rendement en présence de mitochondries animales et d'ATP. Récemment, LINDSTEDT et *al.* (1967) montrèrent qu'il en était de même, en utilisant les bactéries lyophilisées du genre *Achromobacter*. LINDHAL *et al.* (1967) proposent la figure 6 pour le catabolisme de la lysine chez le rat ; ce schéma pourrait être différent chez les *Flavobacterium* et les *Achromobacter*, car ces bactéries possèdent une transaminase, fonctionnant avec le pyridoxal phosphate et qui effectue l'échange entre la lysine et l'α-cétoglutarate en donnant directement le Δ_1-pipéridéine-6-carboxylate (SODA et *al.*, 1966). Chez *N. crassa* (SCHWEET et *al.*, 1954), l'acide pipécolique ne peut permettre la croissance des souches lysine auxotrophes. Il est donc peu probable qu'il soit transformé en α-aminoadipate.

Récemment, BAGINSKI et *al.* (1967) ont montré chez *Pseudomonas* la présence d'une pipécolate déshydrogénase insoluble et d'une α-aminoadipate-δ-semialdéhyde-NAD oxydoréductase soluble qui effectue respectivement la transformation du pipécolate en Δ_1-pipéridéine-6-carboxylate et en α-aminoadipate. Mais il semble que chez cet organisme le catabolisme de la lysine ne suive pas obligatoirement la voie que nous avons signalée car HAGIHIRA et *al.* (1960) ont découvert chez les *Pseudomonas* la présence d'une lysine oxydase qui produit l'acide 5-aminovalérique à partir de la lysine.

Chez les levures, à notre connaissance, on n'a pas signalé la formation d'acide pipécolique à partir de la lysine. SAGISAKA et *al.* (1961) signalent la formation du 5-aminovalérate et de l'acide 2-hydroxy-6-aminohexanoïque à partir de la lysine radioactive chez *Candida utilis*. ROTHSTEIN (1965), employant

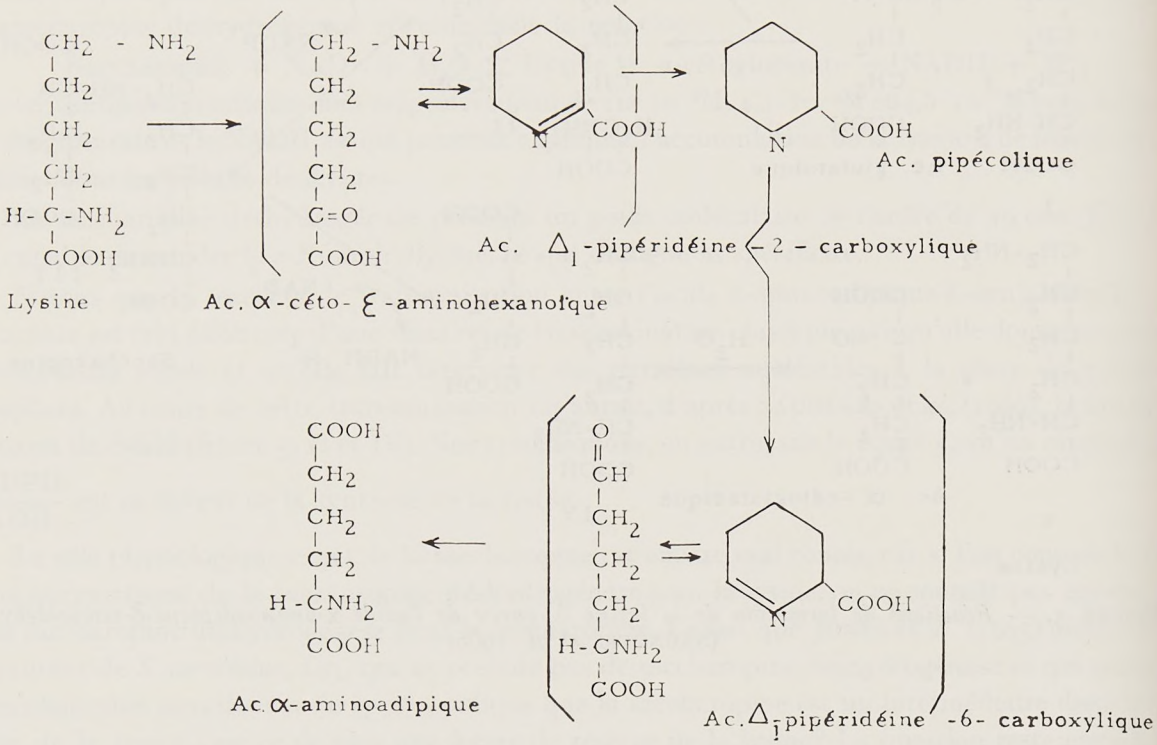


FIGURE 6. — *Réactions du catabolisme de la lysine chez le rat* d'après LINDHAL *et al.* (1967)

la même technique d'étude, étudia le catabolisme de la lysine chez *Hansenula saturnus* qui peut utiliser la lysine comme source d'azote mais pas comme source de carbone. On retrouve dans le milieu de l'ε-acétamido-α-hydroxy-hexanoate, du δ-acétamidopentanoate, du glutarate et de l'ε-N-acétyllysine. Cette découverte de produits acétylés venait vérifier les travaux de PAIK (1963), qui avait montré que la désamination de la lysine était favorisée par une acétylation du groupe ε-aminé. A partir de la lysine on aurait donc la formation de l'ε-N-acétyllysine, qui formerait par désamination l'ε-acétamido-α-cétohexanoate. Cette réaction expliquerait que l'on n'ait pas pu jusqu'à présent mettre en évidence la transamination de la lysine chez les types de levures qui peuvent utiliser la lysine comme source d'azote. L'autre explication serait qu'il se forme de la saccharopine, puisque nous avons vu que la réaction de formation de la lysine est réversible et que le pH optimum est de 7. Récemment HIGASHIMO et *al.* (1967), HUTZLER et *al.* (1968), ont souligné l'importance que pouvait avoir cette réaction dans le catabolisme de la lysine chez le rat chez et l'Homme. Chez la levure, il semble

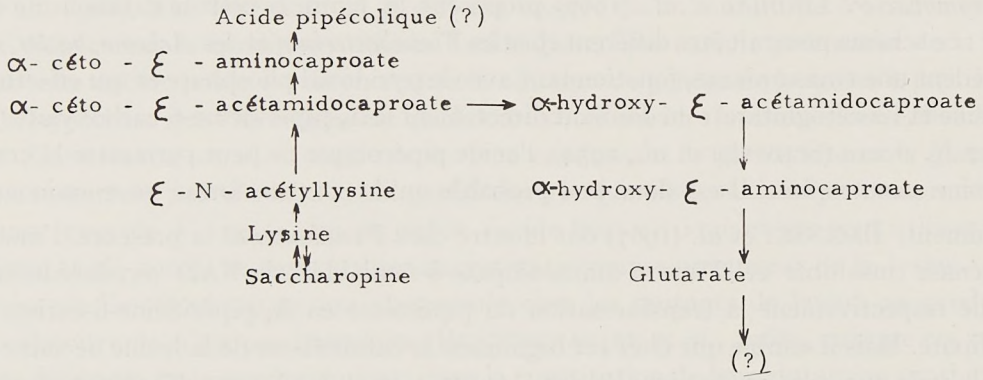


FIGURE 7. — *Réactions du catabolisme de la lysine chez les levures, d'après les données de* ROTHSTEIN (1965)

que cette voie ne doit pas être retenue puisqu'on n'a jamais signalé de formation d'α-amino-δ-semialdéhyde ou d'α-aminoadipate à partir de lysine. On aurait donc chez la levure la figure 7 pour le catabolisme de la lysine. L'acide Δ_1-pipéridéine-6-carboyliquxe, que LARSON et *al.* (1963) ont signalé, est la forme cyclique en équilibre avec l'α-aminoadipate-δ-semialdéhyde. Ces mêmes auteurs n'ont pas pu observer de composé coloré avec l'*o*-aminobenzaldéhyde lorsqu'ils font pousser les levures en présence de lysine. Il paraît donc peu probable qu'il y ait formation d'acide pipécolique, et que la réaction de la lysine soit réversible dans ces conditions.

IV. — CONTRÔLE DE LA BIOSYNTHÈSE DE LA LYSINE

1. *Les levures enrichies en lysine*

Depuis quelques années, on pense qu'il est économique de supplémenter les aliments pauvres en lysine avec des microorganismes enrichis en cet acide aminé (HOWE, 1957). Les études de SAGISAKA et *al.* (1957) ont montré à cet égard que les levures pouvaient convenir, puisqu'on peut notamment augmenter leur teneur en lysine à partir de l'α-aminoadipate. Il semble que ce soit certaines souches de *Saccharomyces* et de *Candida* (BROQUIST, 1960) qui soient particulièrement aptes à effectuer cette transformation. De telles souches contiennent jusqu'à 20 p. 100 de lysine par rapport au poids sec. La forme libre passe de 0,9 p. 100 à 17,3 p. 100, la forme liée reste inchangée et est égale à 3,7 p. 100. L'α-cétoadipate est transformé en lysine avec un meilleur rendement que l'α-aminoadipate; pourtant ce composé subit en plus, vraisemblablement, une réaction de transamination à partir de glutamate. La seule hypothèse formulée est que l'α-cétoadipate pénètre plus facilement dans les cellules que l'α-aminoadipate.

BROQUIST et *al.* (1960) remarquent, sur un milieu à base d'extrait de grain, que la production de lysine à partir de l'α-cétoadipate s'effectue après la croissance exponentielle des levures; par contre, JENSEN et *al.* (1960) trouvent, à partir d'un milieu à base de mélasse, que la croissance des levures et la production de lysine sont deux phénomènes parallèles. Le pourcentage de transformation, exprimé en pourcentage de molécules transformées, est de 30 p. 100 pendant la croissance exponentielle pour 5 g/l d'α-cétoadipate et de 3 p. 100 en fin de culture. Ce résultat est important, car il montre que dans ces conditions, la lysine produite n'a aucun effet sur la croissance des cellules, donc sur leur synthèse.

L'aération a une influence sur la production de lysine : avec 0,95 moles d'O_2 par litre et par minute on obtient la plus forte transformation d'α-cétoadipate en lysine ; avec une aération plus importante, 1,31 moles d'O_2 par litre et par minute, on a une augmentation de la production de levures, mais la teneur en lysine est moins élevée (JENSEN et *al.*, 1960). SAGISHAKA et *al.* (1957) ont aussi noté que la synthèse de la lysine est inhibée par le 2,4-DNP et le NaN_3.

Cet enrichissement anormal du réservoir des acides aminés pose le problème de leur rétention à l'intérieur de la cellule. Nous savons que les acides aminés retenus dans la cellule peuvent être excrétés sous certaines conditions par un phénomène qui ne requiert pas d'énergie (LEWIS et *al.*, 1963, 1965, 1967) et que certaines souches excrètent plus facilement les acides aminés (MORFAUX et DUPUY, 1966). Les levures enrichies en lysine représentent un matériel de choix pour l'étude de ce problème important. L'analyse du *pool* de ces levures apporterait aussi d'utiles renseignements sur les interrelations physiologiques des acides aminés.

2. *Les phénomènes de régulation dans la biosynthèse de la lysine*

Nous savons que les cellules disposent de deux moyens principaux pour régler la vitesse de leurs réactions métaboliques. Il s'agit de l'inhibition de certains enzymes par le produit final des chaînes de réactions et des phénomènes de répression et d'induction de l'activité hétérocatalytique des gènes. Ces deux mécanismes se situent donc à des niveaux très différents du métabolisme cellulaire.

On a longtemps pensé que la synthèse de la lysine n'était pas régulée puisqu'on pouvait obtenir des levures notablement enrichies en lysine (JONES et *al.*, 1965). MARAGOUDAKIS et *al.* (1967) ont montré que la première étape de la synthèse de la lysine, c'est-à-dire la formation de l'acide homocitrique, est sous la dépendance de la concentration en lysine. Un mutant lysine auxotrophe accumule l'acide homocitrique seulement en présence de faibles doses de lysine : avec des extraits cellulaires, $5 \cdot 10^{-3}$M de lysine inhibe 83 p. 100 de la réaction. Notons que pour *E. coli* une concentration $7{,}5 \cdot 10^{-4}$M de lysine inhibe à 95 p. 100 la réaction de l'aspartokinase (PATTE et *al.*, 1964). La chaîne de biosynthèse de la lysine ne fait donc pas exception, la régulation par rétro-inhibition est un phénomène général (UMBARGER, 1961 ; STADMANN et *al.*, 1961).

Récemment HOGG et BROQUIST (1968) ont montré que chez *N. crassa* la lysine produit une rétro-inhibition en même temps qu'une répression de l'enzyme de condensation. Une concentration de 10^{-2}M de lysine entraîne une inhibition de 70 p. 100 alors que 2.10^{-3}M de lysine entraîne une répression de 40 p. 100. On est donc en droit de se demander s'il existe une raison physiologique concernant le peu d'efficacité de la régulation de la lysine ; nous venons de voir que chez *S. cerevisiae* il en était de même. En ce qui concerne le phénomène de rétro-inhibition, ROBICHON-SZULMAJSTER (1967) a aussi observé que la thréonine et la méthionine exogènes n'étaient pas très efficaces dans la répression de l'aspartokinase et de l'homosérine déshydrogénase ; l'auteur explique ce phénomène par une séparation du *pool* des acides aminés avec le site de formation des répresseurs. Si, pour la répression, la compartimentation des cellules peut expliquer le peu d'efficacité de la lysine, lorsqu'on étudie l'inhibition *in vitro*, l'explication n'est plus satisfaisante.

Nous avons vu que l'on peut obtenir chez la levure de grandes quantités de lysine lorsqu'on introduit l'α-aminoadipate dans le milieu de culture. Il semble qu'il n'en soit pas de même chez *N. crassa* qui utilise pourtant une voie de biosynthèse similaire (TRUPIN et *al.*, 1965). Chez un mutant de *Neurospora* n'ayant pas de saccharopine déshydrogénase, la lysine exogène a une action sur la saccharopine formée à partir de l'α-aminoadipate. Ce fait souligne une fois encore que, si l'on observe une grande similitude dans les voies de biosynthèse, pour leur intégration dans le métabolisme cellulaire, il peut y avoir de grandes différences. Par exemple, *Micrococcus glutamicus*, à la différence d'*E. coli* peut excréter beaucoup de lysine parce que sa déshydropicolinate synthétase est vraisemblablement moins sensible à une forte concentration de lysine (HUANG, 1964).

ROBICHON-SZULMAJSTER (1967) signale que la lysine est capable, chez *S. cerevisiae*, de réprimer la synthèse de l'aspartokinase A et d'inhiber le fonctionnement de l'aspartokinase B, l'aspartokinase B étant l'aspartokinase réprimée par la méthionine alors que l'aspartokinase A est réprimée par l'homosérine et la thréonine. Cette action surprenante de la lysine est interprétée, d'après cet auteur, « comme représentant un reliquat de l'évolution ayant maintenu un système de régulation par un métabolite désormais synthétisé par une chaîne indépendante ». On ne connaît pas, en effet, de raison physiologique permettant d'expliquer l'action de la lysine sur l'aspartokinase. De même ANDERSON-KOTTO et *al.* (1963) n'en ont pas donné lorsqu'ils ont montré chez *N. crassa*, qui présente de grandes similitudes métaboliques avec *S. cerevisiae*, que la lysine exogène produit une inhibition de la voie arginine-proline et par là provoque une accumulation d'arginine. A une plus forte concentration de lysine, on observe aussi une diminution dans la transformation ornithine-citrulline. Chez un mutant lysine auxotrophe, il apparaît aussi que les précurseurs de la lysine ont une influence sur les réactions du cycle de l'ornithine.

Récemment, BHATTACHARJEE, et *al.* (1968 *a*) ont découvert que seules les souches de levures auxotrophes, qui produisent l'acide homoisocitrique, accumulent l'α-cétoglutarate dans le milieu de culture. On se pose le problème de l'origine de cet acide, car les souches étudiées ne présentent pas de déficience respiratoire et elles ont un taux normal de glutamate synthétase.

De même, on ne comprend encore pas pourquoi une souche lysine auxotrophe de *N. crassa* sans enzyme de condensation puisse accumuler dans le milieu de culture le citrate et le malate (HOGG et *al.*, 1968). Chez *S. cerevisiae* on n'observe pas ce phénomène, puisque la souche sauvage et le mutant accumulent l'acide malique (BHATTACHARJEE et *al.*, 1968 *b*).

L'étude de la synthèse de la lysine chez la levure a permis de constater qu'il fallait bien se garder des généralisations trop hâtives. La biosynthèse de la lysine est une exception à la convergence extraordinaire des voies de biosynthèse (COHEN, 1967). En effet, chez les bactéries, cet acide aminé est synthétisé à partir de l'acide aspartique par la voie de l'acide diamino-pimélique, étudiée en détail chez *E. coli*, notamment par WORK (1951), DAVIS (1952), UMBARGER et *al.* (1962). Il en est de même pour certaines algues (ROTHSTEIN, 1963) et les plantes supérieures (COHEN, 1967) (figure 8). Chez les levures, la lysine provient de l'α-cétoglutarate par la voie de l'acide α-aminoadipique (figure 9).

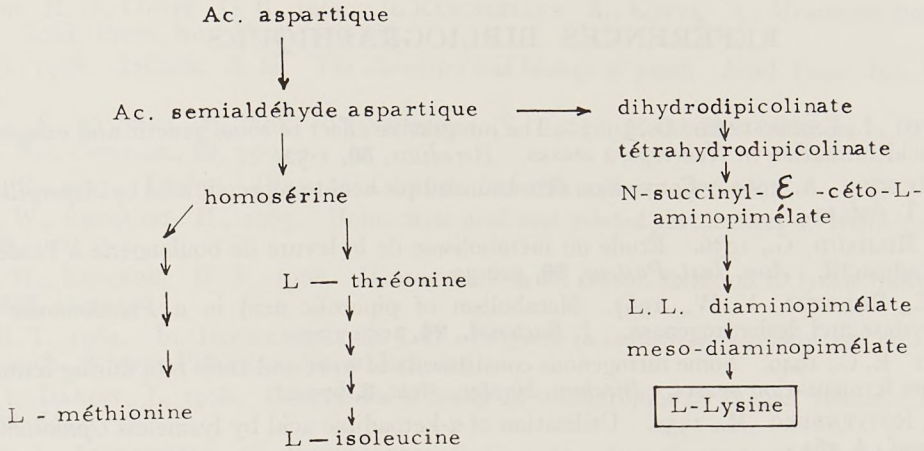


FIGURE 8. — *Les différentes étapes de la biosynthèse de la lysine chez les bactéries et les plantes supérieures*

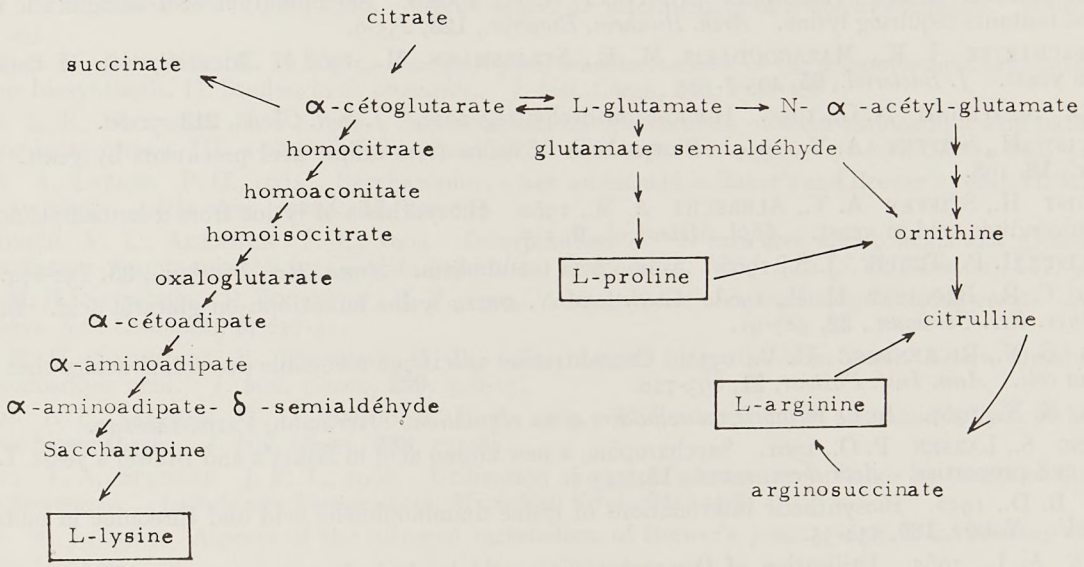


FIGURE 9. — *Résumé de la biosynthèse de la L-lysine, L-proline et L-arginine chez la levure*

« Il est tentant de penser que la voie de l'acide α-aminoadipique est peut-être plus économique que la voie de l'acide diaminopimélique et a été sélectionnée durant l'évolution des levures et des moisissures. Les bactéries, chez lesquelles l'acide diaminopimélique est un composé utile à la structure de la paroi, n'ont eu qu'à acquérir une décarboxylase supplémentaire pour obtenir leur lysine faisant ainsi l'économie de la synthèse des enzymes de la voie de l'acide α-aminoadipique » (COHEN, 1967). Selon VOGEL (1959, 1960) cette différence dans les voies de synthèse de la lysine est une indication phylogénique précieuse : c'est ainsi que les *Chlorella* apparaissent reliées aux bactéries alors que les *Euglena* sont plus proches des champignons que des bactéries.

Outre cette importance phylogénique, les études sur la biosynthèse de la lysine ont un aspect pratique important : la lysine est un acide aminé essentiel pour l'homme et les animaux et souvent on doit supplémenter les aliments d'origine végétale de manière à les équilibrer. La production de cet acide aminé sous forme L par voie microbiologique reste encore économiquement avantageuse (HUANG, 1964 ; MCPHERSON, 1966).

Reçu pour publication en mai 1969.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDERSON-KOTTO I., EHRENSVARD G., 1963. The integrative effect of some genetic and exogenous factors upon amino acid formation in *Neurospora crassa*. *Hereditas*, **50**, 1-52.

ASPEN A. J., MEISTEN A., 1962. Conversion of α-aminoadipic acid to pipecolic acid by *Aspergillus nidulans*. *Biochemistry*, **1**, 606-12.

AUBERT J.-P., MILHAUD G., 1956. Étude du métabolisme de la levure de boulangerie à l'aide de glucose et d'éthanol radioactif. *Ann. Inst. Pasteur*, **90**, 320-32.

BAGINSKI M. E., RODWELL V. W., 1967. Metabolism of pipecolic acid in a *Pseudomonas species*. V. Pipecolate oxydase and deshydrogenase. *J. Bacteriol.*, **94**, 1034-1039.

BARTON-WRIGHT E. C., 1949. Some nitrogenous constituents of wort and their fate during fermentation by top and bottom fermentation yeasts. *Biochim. biophys. Acta*, **3**, 679-91.

BERGSTRON J., ROTTENBERG M., 1950. Utilization of α-ketoadipic acid by lysineless *Ophiostama* mutants. *Acta chem. scand.*, **4**, 563.

BHATTACHARJEE J. K., STRASSMANN M., 1967 *a*. Accumulation of tricarboxylic acids related to lysine biosynthesis in a yeast mutant. *J. biol. Chem.* **242**, 2542-6.

BHATTACHARJEE J. K., STRASSMANN M., 1967 *b*. Accumulation of α-ketoadipic acid by a lysine requiring yeast mutant. *J. Albert Einstein Med. Center*, **15**, 44-9.

BHATTACHARJEE J. K., STRASSMANN M., TUCCI A. F., 1968 *a*. Accumulation of α-ketoglutaric acid in yeast mutants requiring lysine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**, 235-9.

BHATTACHARJEE J. K., MARAGOUDAKIS M. E., STRASSMANN M., 1968 *b*. Identification of malic acid from yeast. *J. Bacteriol.*, **95**, 495-7.

BLANCK S., WRIGHT N. G., 1955. Homoserine deshydrogenase. *J. biol. Chem.*, **213**, 51-60.

BROQUIST H., STIFFEY A. V., 1959. Biosynthesis of lysine from adipic acid precursors by yeast. *Feder. Proc.*, **18**, 198.

BROQUIST H., STIFFEY A. V., ALBRECHT A. M., 1960. Biosynthesis of lysine from α-ketoadipic acid and α-aminoadipic acid in yeast. *Appl. Microbiol.*, **9**, 1-5.

BROQUIST H. P., TRUPIN J. S., 1966. Amino acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, **35**, 231-274.

BURKE C. R., BROQUIST H. P., 1968. Growth of *N. crassa* lysine auxotroph on glutaric acid. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **32**, 487-91.

COHEN G. N., RICKENBERG H. V., 1958. Concentration spécifique réversible des amino-acides chez *Escherichia coli*. *Ann. Inst. Pasteur*, **91**, 693-720.

COHEN G. N., 1967. In *Le métabolisme cellulaire et sa régulation*. Hermann, Paris, 140-142.

DARLING S., LARSEN P. O., 1961. Saccharopine, a new amino acid in Baker's and Brewer's yeast. I. Isolation and properties. *Acta chem. scand.*, **15**, 743-9.

DAVIS B. D., 1952. Biosynthetic interrelations of lysine diaminopimelic acid and threonine in mutants of *E. coli*. *Nature*, **169**, 534-35.

DEMAIN A. L., 1963. Utilization of D-α-aminoadipic acid by lysineless mutants of ascomycetous fungi. *Canad. J. Microbiol.*, **9**, 111-15.

EDDY A. A., 1958. In COOK A. K. *The chemistry and biology of yeast*. Acad. Press. Inc. Publ. New York, 157-249.

EHRENSVARD G., REIO L., SALUSTE E., STJERNHORM R., 1951. Acetic acid metabolism in *Torulopsis utilis*. III. Metabolic connection between acetic acid and various aminoacids. *J. biol. Chem.*, **189**, 93-108.

GILVARG C., BLOCK K., 1951. Utilization of acetic acid for amino acid synthesis in yeast. *J. biol. Chem.*, **193**, 339-45.

GRENSON M., MOUSSET M., WIAME J. M., BECHET J., 1966 *a*. Multiplicity of the amino permeases in *S. cerevisiae*. I. Evidence for a specific arginine transporting system. *Biochim. biophys. Acta*, **127**, 325-38.

GRENSON M., 1966 *b*. Multiplicity of the amino acid permeases in *S. cerevisiae*. II. Evidence for a specific lysine-transporting system. *Biochim. biophys. Acta*, **127**, 339-46.

GRENSON M., 1967. Le transport des métabolites, en particulier des acides aminés, à travers les membranes cellulaires. *Rev. Ferment. Industr. alim.*, **22**, 7-20.

GROBBELAAR N., STEWARD F. C., 1953. Pipecolic acid in *Phaseolus vulgaris* : Evidence on its derivation from lysine. *J. amer. chem. Soc.*, **75**, 4341-3.

HAGIHIRA H., HAYASLI H., ICHIHARA A., SUDA M., 1960. Metabolism of L-lysine by bacterial enzymes. *J. Biochem.* (Tokyo), **48**, 267-76.

HALVORSON H. O., SPIEGELMANN S., 1953 *a*. The effect of free amino acid pool levels on the induced synthesis of enzymes. *J. Bacteriol.*, **65**, 496-504.

HALVORSON H. O., SPIEGELMANN S., 1953 *b*. Net utilization of free amino acids during the induced synthesis of maltozymase in yeast. *J. Bacteriol.*, **65**, 601-608.

HALVORSON H. O., COHEN G. N., 1968. Incorporation des amino-acides endogènes et exogènes dans les protéines de la levure. *Ann. Inst. Pasteur*, **95**, 73-87.

HALVORSON H. O., COWIE D. B., 1961. In KLEINZELLER A., KOTYK A., *Membrane transport and metabolism*. Acad. Press. New York, 479-487.

HARRIS G., 1958. InCOOK A. H. *The chemistry and biology of yeast*. Acad. Press. Inc. Publ. New York, 437-533.

HIGASHINO K., FUJIOKA M., AOKI T., YMAMORA Y., 1967. Metabolism of lysine in rat liver. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **29**, 95-100.

HOWE E. E., 1957. Lysine. *Drug and Cosmetic Ind.*, **80**, 448-449, 526-532.

HOOG R. W., BROQUIST H., 1965. Homocitric acid and related metabolites as lysine precursors. *Feder. Proc.*, **25**, 710.

HOGG R. W., BROQUIST H. P., 1968. Homocitrate in *N. crassa*. Relation to lysine biosynthesis. *J. biol. Chem.*, **243**, 1839-45.

HUANG H. T., 1964. In HOCKENHULL D. J. D., *Progress in industrial microbiology*. Vol. 5, 55-92. Gordon and Breach, Science Publisher, Great Britain.

HUTZEL J., DANCIS J., 1968. Conversion of lysine to saccharopine by human tissues. *Biochim. biophys. Acta*, **158**, 62-9.

HWANG Y. L., LINDEGREEN G., LINDEGREEN C. C., 1966. Genetic study of lysine biosynthesis in yeast. *Canad. J. Genet. Cytol.*, **8**, 471-80.

JENSEN A, SHU P., 1960. Production of lysine rich yeast. *Appl. Microbiol.*, **9**, 12-15.

JONES E. E., BROQUIST H. P., 1961. Separation and partial characterization of lysine precursor produced by a yeast mutant. *Biochem. biophys. Acta*, **51**, 651-56.

JONES E. E., SAUNDERS P. E., 1963. Saccharopine, an intermediate of lysine biosynthesis. *Feder. Proc.*, **22**, 243.

JONES E. E., BROQUIST H. P., 1965. Saccharopine, an intermediate of the α-aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis. II. Studies in *S. cerevisiae*. *J. biol. Chem.*, **240**, 2531-36.

JONES E. E., BROQUIST H. P., 1966. Saccharopine, an intermediate of the α-aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis. III. α-aminoadipic semialdehyde glutamate reductase. *J. biol. Chem.*, **241**, 3430-4.

KJAER A., LARSEN P. O., 1961. Saccharopine, a new aminoacid in Baker's and Brewer's yeast. II. Structure and synthesis. *Acta chem. scand.*, **15**, 750-759.

KRETOVICH V. L., AUERMAN T. L., 1964. Incorporation of ^{15}N into free amino acids and glutamine in assimilation of ammonia ^{15}N by *Candida tropicalis*. *Dokl. Akad. Nauk S. S. S. R.* (Moscou), **157**, 986-8.

KUO M. H., SAUNDERS P., BROQUIST H. P., 1962. A metabolite of α-aminoadipic acid in yeast. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **8**, 227-31.

KUO M. H., SAUNDERS P., BROQUIST H. P., 1964. Lysine biosynthesis in yeast. A new metabolite of α-aminoadipic acid. *J. biol. Chem.*, **239**, 508-15.

LARSON B. L., SANDINE W. D., BROQUIST H. P., 1963. Enzymic reduction of α-aminoadipic. Relation to lysine biosynthesis. *J. biol. Chem.*, **238**, 275-82.

LA RUE T. A., SPENCER J. F. T., 1968. Utilization of organic nitrogen compounds by yeasts of the genus *Saccharomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek, Microbiol. Serol.*, **34**, 153-8.

LEWIS M. J., 1963. Aspects of the nitrogen metabolism of Brewer's yeast. *Ann. Soc. Brewing Chemists Proc.*, 114-123.

LEWIS M. J., PHAFF H. J., 1965. Release of nitrogenous substance by Brewer's yeast. *J. Bacteriol.*, **89**, 960-66.

LEWIS M. J., STEPHANOPOULOS D., 1967. Glucose induced release of amino acid from *Saccharomyces carlsbergensis* by action on cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.*, **93**, 976-84.

LINDAHL G., LINDSTEDT G., LINDSTEDT S., 1967. Metabolism of α-amino-5-hydroxyadipic acid in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 347-52.

LINDSTEDT S., LINDSTEDT G., MITOMA C., 1967. Studies on the metabolism of lysine and 5-hydroxylysine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 336-346.

LOWY P., 1953. The conversion of lysine to pipecolic acid by *Phasaeolus vulgaris*. *Arch. Biochem. Biophys.* **47**, 228-9.

MARAGOUDAKIS M. E., HOLMES H., CECI L. N., STRASSMANN M., 1966. Homoaconitate formation by a lysine requiring yeast mutant. *Feder. Proc.*, **24**, 710.

MARAGOUDAKIS M. E., STRASSMANN M., 1966 *b*. Homocitric acid accumulation by a lysine requiring yeast mutant. *J. biol. Chem.*, **241**, 695-9.

MARAGOUDAKIS M. E., HOLMES H., STRASSMANN M., 1967. Control of lysine biosynthesis in yeast by a feedback mechanism. *J. Bacteriol.*, **93**, 1677-80.

MARAGOUDAKIS M. E., 1967. Homoaconitic acid accumulation by a lysine requiring yeast mutant. *J. Bacteriol.*, **94**, 1060-5.

MARTIUS C., SCHOWE G., 1950. Synthesis and structure of α,α-dideuteriocitric acid. *Z. Naturforsch.*, **5** *b*, 170.

MATTOON J. R., 1961. Separation and partial characterization of lysine precursor by a yeast. *Biochim. biophys. Acta*, **51**, 615-17.

MCPHERSON A. T., 1966. Production of lysine and methionine. *Adv. Chem. Ser.*, **57**, 65-74.

MEISTER A., BUCKLEY S. D., 1967 *a*. Pyridine nucleotide dependant reduction of ketoacid analog of lysine to L-pipecolic acid. *Biochim. biophys. Acta*, **23**, 202-203.

MEISTER A., RADHAKUSHNAN A. N., BUCKLEY S. D., 1967 *b*. Enzymic synthesis of L-pipecolic acid and L-proline. *J. biol. Chem.*, **229**, 789-800.

MEISTER A., BUKENBERGER M., 1962. Enzyme conversion of D-glutamic to D-pyrrolidone carboxylic acid by mammalian tissues. *Nature*, **194**, 557-559.

MITCHELL K. H., HOULALAN M. B., 1948. An intermediate in the biosynthesis of lysine in *Neurospora*. *J. biol. Chem.*, **174**, 883-887.

MOAT A. G., AHMAD F., 1965. Biosynthesis and interrelationships of amino acids in yeast. *Wallerstein Lab. Communic.*, **28**, 111-136.

MORFAUX J. N., DUPUY P., 1966. Comparaison de l'exsorption des acides aminés par une souche de *S. cerevisiae* et un mutant résistant à la canavanine. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **263**, 1224-1227.

MORRIS E. O., 1958. In COOK A. K. *The chemistry and biology of yeast*. Acad. Press. Inc., Publ., New York, 251-321.

NICHOLAS D. J. D., 1965. In AINSWORTH G. C., SUSSMAN A. S. *The fungi : an advanced treatise*. Vol. I. Acad. Press. New York, London, 349-376.

OCHOA S., 1953. II[e] *Congrès Intern. Biochem., Symposium cycle tricarboxylique*, Paris 21-7 July 1952, 73-88.

OGSTON A. G., 1958. Interpretation of experiments on metabolite processes using i sotopic tracer elements. *Nature*, **162**, 963.

PAIK W. K., 1963. A comparative study of lysine acylase. *Comp. Biochem. Physiol.*, **9**, 13-22.

PALL M. L., 1969. Amino acid transport in *Neurospora crassa*. I. Properties of two amino acid transport systems. *Biochim. biophys. Acta*, **173**, 113-127.

PATTE J. C., COHEN G. N., 1964. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **159**, 1255-1258, cité par COHEN (1967).

ROBICHON-SZULMAJSTER H., 1961. Contribution à l'étude génétique et physiologique du métabolisme du galactose chez la levure. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 81-142 ; 185-256.

ROBICHON-SZULMAJSTER H., 1967. Régulation du fonctionnement de deux chaînes de biosynthèse chez *S. cerevisiae* : Thréonine-méthionine et isoleucine-valine. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **49**, 1431-1462.

ROTHSTEIN M., MILLER L. L., 1954. The conversion of lysine to pipecolic acid in the rat. *J. biol. Chem.* **211**, 851-858.

ROTHSTEIN M., COOKSEY K., GREENBERG D. M., 1961. Metabolic conversion of pipecolic acid to α-aminoadipic. *J. biol. Chem.*, **237**, 2828-2830.

ROTHSTEIN M., SAFRON E. M., 1963. Lysine biosynthesis in algae. *Arch. Biochem. Biophys.*, **101**, 373-377.

ROTHSTEIN M., 1965. Intermediates of lysine dissimilation in yeast *Hansenula saturnus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 467-476.

SAGISAKA S., SHIMURA K., 1957. Lysine formation in yeast cells. *Nippon Nóger-Kagaku Kaishi*, **31**, 110-114.

SAGISAKA S., SHIMURA K., 1960. Mechanism of activation and reduction of α-aminoadipic acid by yeast enzymes. *Nature*, **188**, 1189.

SAGISAKA S., SHIMURA K., 1961. Lysine biosynthesis : II. Metabolic fate of D-L-α-aminoadipic acid-6-^{14}C in *T. utilis*. *J. Biochem.* (Tokyo), **49**, 392-396.

SAUNDERS P. P., BROQUIST H. P., 1966. Saccharopine, an intermediate of α-aminoadipic acid pathway lysine biosynthesis. IV. Saccharopine deshydrogenase. *J. biol. Chem.*, **241**, 3435-3440.

SCHULTZ A. S., MCMANUS D. K., POMPER S., 1949. Amino acids as carbon source for the gowth of yeasts *Arch. Biochem. Biophys.*, **22**, 412-419.

SCHWEET R. S., HOLDEN J. J., LOWY P. H., 1954. Metabolism of lysine in *Neurospora*. *J. biol. Chem.*, **211**, 517-529.

SHEIFINGER C., OGUR S., OGUR M., 1966. *Feder. Proc.*, **25**, 710. Cité par STRASMANN et CECI, 1966.

SIMS A. P., FOULKES B. P., 1964. Kinetic study of the assimilation of $^{15}NH_3$ and the synthesis of α-amino acids in an exponentially growing culture of *C. utilis*. *Proc. r. Soc. Ser. B*, **159**, 479-502.

SODA K., MISONO H., YAMAMOTO T., 1966. L-lysine-α-ketoglutaric acid transaminase reaction. Identification of the product from L-lysine. *Agric. biol. Chem.*, **30**, 944-946.

STADTMANN E. R., COHEN G. N., 1961. Feed back inhibition and repression of aspartokinase activity in *E. coli* and *S. cerevisiae*. *J. biol. Chem.*, **236**, 2033-2038.

STRASSMANN M., WEINHOUSE S., 1952 *a*. The biosynthesis of arginine by *Torulopsis utilis*. *J. amer. chem. Soc.*, **74**, 1726-30.

STRASSMANN M., WEINHOUSE S., 1952 *b*. Biosynthesis in *T. utilis*. *J. amer. chem. Soc.*, **74**, 3457-3458.

STRASSMANN M., WEINHOUSE S., 1953. Biosynthesis pathway. III. The biosynthesis of lysine by *Torulopsis utilis*. *J. amer. chem. Soc.*, **75**, 1680-1684.

STRASSMANN M., CECI L. M., 1964 *a*. Enzymatic formation of homocitric acid, an intermediate in lysine biosynthesis. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **14**, 262-267.

STRASSMANN M., CECI L. M., SILVERMANN B. E., 1964 *b*. Enzymatic conversion of homoisocitric acid into α-ketoadipic acid. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **14**, 268-271.

STRASSMANN M., CECI L. M., 1965 *a*. Enzymatic formation of ketoadipic acid from homoisocitric acid. *J. biol. Chem.*, **240**, 4357-4361.

STRASSMANN M., CECI L. M., MARAGOUDAKIS M. E., 1965 *b*. Homoaconitase in yeast. *Feder. Proc.*, **24**, 228.

STRASSMANN M., CECI L. M., 1966. Enzymatic formation of *cis*-homoaconitic acid, an intermediate in lysine biosynthesis in yeast. *J. biol. Chem.*, **241**, 5401-5407.

STRASSMANN M., CECI L. M., 1967. A study of acetyl CoA condensation with α-keto-acids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 420-428.

SUOMALAINEN H., RAIKAINEN P., 1963. Keto-acids in baker's yeast in fermentation solutions. *J. Inst. Brewing*, **69**, 478-483.

SURDIN et *al.*, 1965. Propriété et contrôle génétique du système d'accumulation des acides aminés chez *S. cerevisiae*. *Biochim. biophys. Acta*, **107**, 546-566.

TANENBAUM S. W., KANEKO K., 1964. Biosynthesis of dipicolinic acid and of lysine in *Penicillium citreoviride*. *Biochemistry*, **3**, 1314-1322.

TAYLOR, SHIRLEY K., 1947. The assimilation of amino acids by bacteria and yeasts. *J. gen. Microbiol.*, **1**, 86-90.

TAYLOR, SHIRLEY K., 1949. *J. gen. Microbiol.*, **3**, 211, cité par EDDY.

THORNE R. S. W., 1941. The growth and fermentation of a strain of *S. cerevisiae* with amino acids as nutriments. *J. Inst. Brewing*, **47**, 255-72.

UMBARGER H. E., 1961. End product inhibition of the initial enzyme in a biosynthesis sequence as mechanism of feed back control. *Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology*, **26**, 301-312.

UMBARGER H. E., DAVIS B. D., 1962. In GUNSALUS I. C., STANIER R. Y. *The Bacteria*, Vol. III, 167-252. Acad. Press. New York.

VAUGHAN S. T., BROQUIST H. P., 1965. Saccharopine deshydrogenase, a marker of the α-aminoadipic acid pathways in lysine biosynthesis. *Feder. Proc.*, **24**, 218.

VOGEL H. J., 1959. Lysine biosynthesis in *Chlorella and Euglena* phylogenetic signifiance. *Biochim. biophys. Acta*, **34**, 282-283.

VOGEL H. J., 1960. Two modes of lysine synthesis among lower fungi, evolution signifiance. *Biochim. biophys. Acta*, **41**, 172-173.

WALTERS L. S.., THISELTON M. R., 1953. Utilization of lysine by yeasts. *J. Inst. Brewing.*, **59**, 401-404.

WEBER M. A., HOAGLAND A. N., KEEIN J., LEWIS K., 1964. Biosynthesis of α-ketoadipic acid by extracts of baker's yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, **104**, 237-266.

WORK E., 1950. A new naturally occuring amino acid. *Nature*, **165**, 74-75.

YURA T., VOGEL H. J., 1957. The glutamic family and lysine in *Neurospora* enzyme formation of glutamic-γ-semialdehyde and aminoadipic-δ-semialdehyde from penta- and hexahomoserine. *Biochim. biophys. Acta*, **24**, 648.

YURA T., VOGEL H. J., 1959. An ω-cohydroxy-α-amino deshydrogenase of *N. crassa*. Partial purification and somes properties. *J. biol. Chem.*, **234**, 339-342.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (2), 161.

CHRONIQUE DES LIVRES

CHAMBRES FROIDES A ATMOSPHÈRE CONTRÔLÉE. — Entreposage des produits surgelés. — Paris, Institut international du Froid, 1969, 144 p.

Cet ouvrage appartient à la collection « Science et Technique du Froid » titre sous lequel l'Institut international du Froid publie les rapports et discussions développées au cours des réunions de ses commissions internationales scientifiques et techniques. Il rend compte des travaux de la Commission V (Entreposage frigorifique) réunie à Avignon (France) du 9 au 11 octobre 1968. Ces comptes rendus constituent en fait la suite de l'ouvrage publié par l'I. I. F. à l'issue des réunions des Commissions IV et V à Bologne en 1966.

Dix-huit études y sont présentées sous la signature d'experts, parmi les plus qualifiés dans leurs domaines respectifs.

Dans une première section, six rapports sont consacrés à l'entreposage des produits surgelés : tendances générales actuelles, réalisations des conditions optimales d'entreposage et de manutention.

Douze rapports étudient ensuite les problèmes relatifs aux chambres à atmosphère contrôlée : tests d'étanchéité des chambres, mise en régime gazeux des locaux, stabilisation de l'atmosphère de conservation, intérêt économique de ce type de conservation, tendances actuelles en Italie et en France.

Onze communications sont rédigées en français, sept en anglais. Pour chacune d'elles, un résumé dans l'autre langue est inclus dans le compte rendu qui reproduit également les discussions auxquelles ont donné lieu les études.

RECOMMANDATION AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement*, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *sommaire :* résumé suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds les dons...; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet*. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de et *al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé selon la *World List of Scientific Periodicals*, ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets*, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des Annales est : 16 × 24 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12,4 photos 9 × 55,6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront une épreuve à corriger.

Envoi du manuscrit : M. Flanzy, Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne, France, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, 78 - Jouy-en-Josas. On demande deux exemplaires.

Le Directeur de la publication: M.-L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 11-1969

Dépôt légal: 4e trimestre 1969. N° d'impression: 1199.

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 18 1969 NUMÉRO 3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des sommaires et résumés

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (3), 167-185.

INFLUENCE DE L'INSAPONIFIABLE SUR LA STABILITÉ DU BEURRE. SA PROTECTION PAR L'ACIDE ASCORBIQUE

R. ALIFAX

Laboratoire de Recherches de la Chaire des Industries agricoles, Institut national agronomique, 16, rue Claude-Bernard, 75 - Paris (5e)

SOMMAIRE

Dans ce mémoire, nous avons souligné l'influence de l'insaponifiable du beurre sur la stabilité de ce produit. Il est apparu que la disparition de ses principaux éléments constitutifs coïncidait avec le début de la phase d'auto-oxydation de la matière grasse.

Nos essais ont montré que l'acide ascorbique, additionné au beurre, assure sensiblement la stabilité des constituants de l'insaponifiable qui agissent comme antioxydants.

Ceci montre l'intérêt que nous attacherons ultérieurement à une étude détaillée du rôle respectif de chacun des éléments qui constituent l'insaponifiable des beurres.

I. — INFLUENCE DES ÉLÉMENTS DE L'INSAPONIFIABLE

A. — *Observations préliminaires*

Des observations faites sur des échantillons de beurre maintenus en chambre froide à des températures voisines de 15°C, ont permis de mettre en évidence, pour certains d'entre eux, des signes d'une altération manifeste, traduite par la dégradation de leurs propriétés organoleptiques et, parallèlement, par l'évolution de leur indice de peroxyde.

Nous avons tout d'abord pensé que l'évolution de l'indice de peroxyde traduisait des modifications au niveau des liaisons éthyléniques des acides gras polyinsaturés.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons soumis un échantillon de beurre à un test d'oxydation accélérée.

B. — *Méthodes expérimentales*

Nous avons fait fondre 200 g de beurre dans un bain-marie à 40°C, puis séparé les fractions non lipidiques par centrifugation. La phase huileuse était ensuite versée dans une boîte de Petri de 290 mm de diamètre et 35 mm de profondeur. Ces dimensions ont été retenues pour obtenir une grande surface de contact avec l'air sous une faible épaisseur. L'épaisseur de la couche huileuse dans la boîte de Petri était d'environ 10 mm.

La boîte était ensuite posée sur une plaque chauffante maintenue à 40°C. Une cloche en verre reposant sur des tasseaux de bois, pour assurer une circulation d'air, recouvrait la boîte de Petri. L'expérience a été réalisée à la lumière du jour.

Nous avons procédé au dosage des liaisons éthyléniques sur des prélèvements successifs. La détermination des diènes, triènes et tétraènes conjugués et non conjugués a été faite selon la méthode décrite dans l'A. O. C. S. (Official Method (Polyunsaturated Acids Ultraviolet Spectrophotometric Method Cd 7-48)).

Parallèlement, nous avons procédé à la détermination de l'indice de peroxyde, selon la technique proposée par Loftus-Hill et Thiel (1945), et dosé les principaux éléments de l'insaponifiable.

La saponification a été réalisée dans les conditions suivantes. Dans un erlenmeyer de 200 ml, on pèse 10 g de la fraction lipidique du beurre, obtenue comme précédemment. Cette fraction doit être limpide. On ajoute ensuite 10 ml d'une solution aqueuse de KOH à 50 p. 100, puis 40 ml d'alcool éthylique redistillé sur MnO_4K et NaOH. Le tout est chauffé 10 minutes dans un bain-marie bouillant. Immédiatement après, on ajoute 50 ml d'eau distillée froide et on transverse dans une ampoule à décanter de 50 ml . L'erlenmeyer est rincé avec 40 ml d'eau et l'eau de rinçage versée dans l'ampoule. Après refroidissement, on y ajoute 100 ml d'oxyde d'éthyle sans peroxyde (distillé en présence de chlorure stanneux). On extrait ainsi en une première fois la majeure partie de l'insaponifiable. L'extraction est ensuite achevée en traitant deux fois le savon de potasse par 50 ml d'éther de pétrole (traité par SO_4H_2 au 1/10 de son volume, lavé à l'eau et distillé).

Après décantation on rassemble les deux fractions éthérées dans un ballon dans lequel on a pesé au préalable 20 g de SO_4Na_2. On agite, puis on filtre. Le volume est réduit par évaporation sous pression réduite et amené finalement à 100 ml.

La vitamine A et les caroténoïdes totaux sont séparés par chromatographie sur une colonne d'alumine selon la méthode de Servigne *et al.* (1950).

Les dosages sont faits dans les conditions suivantes : la vitamine A, reprise dans 10 ml d'isopropanol, dans l'UV à 327 mμ, les caroténoïdes totaux en solution dans 10 ml d'hexane à 440 mμ, les tocophérols selon la méthode de Mahon et Chapman (1954) à 515 mμ, le cholestérol selon la technique de Macheboeuf et Delsal (1942) à 650 mμ.

C. — *Résultats*

Ils sont groupés dans les tableaux 1 et 2.

Dans le tableau 1, les résultats sont exprimés en pourcentage d'acides gras insaturés diminués de l'acide oléique.

TABLEAU 1

Évolution des liaisons éthyléniques pendant 336 heures d'auto-oxydation

Durée du traitement (en heures)	Acides gras polyinsaturés pour cent des acides gras					
	à liaisons conjuguées			à liaisons non conjuguées		
	2	3	4	2	3	4
0	1,243	0,214	0	1,854	1,510	0,54
96	1,645	0,017	0	—	1,520	0,49
168	1,51	0,01	0	1,323	0,40	0,44
336	0	0	0	0,40	0	0

TABLEAU 2

Variations de l'indice de peroxyde et du taux des principaux éléments de l'insaponifiable

Durée du traitement (en heures)	Indice de peroxyde	Vitamine A	Caroténoïdes totaux	Tocophérols	Cholestérol total
0	0,2	0,30	0,17	0,13	0,19
96	2	0,28	0,16	0,11	0,19
168	21	—	—	—	0,20
192	59	—	—	—	0,18
216	107	—	—	—	0,19
240	147	—	—	—	0,20
262	225	—	—	—	0,19
336	230	—	—	—	0,17

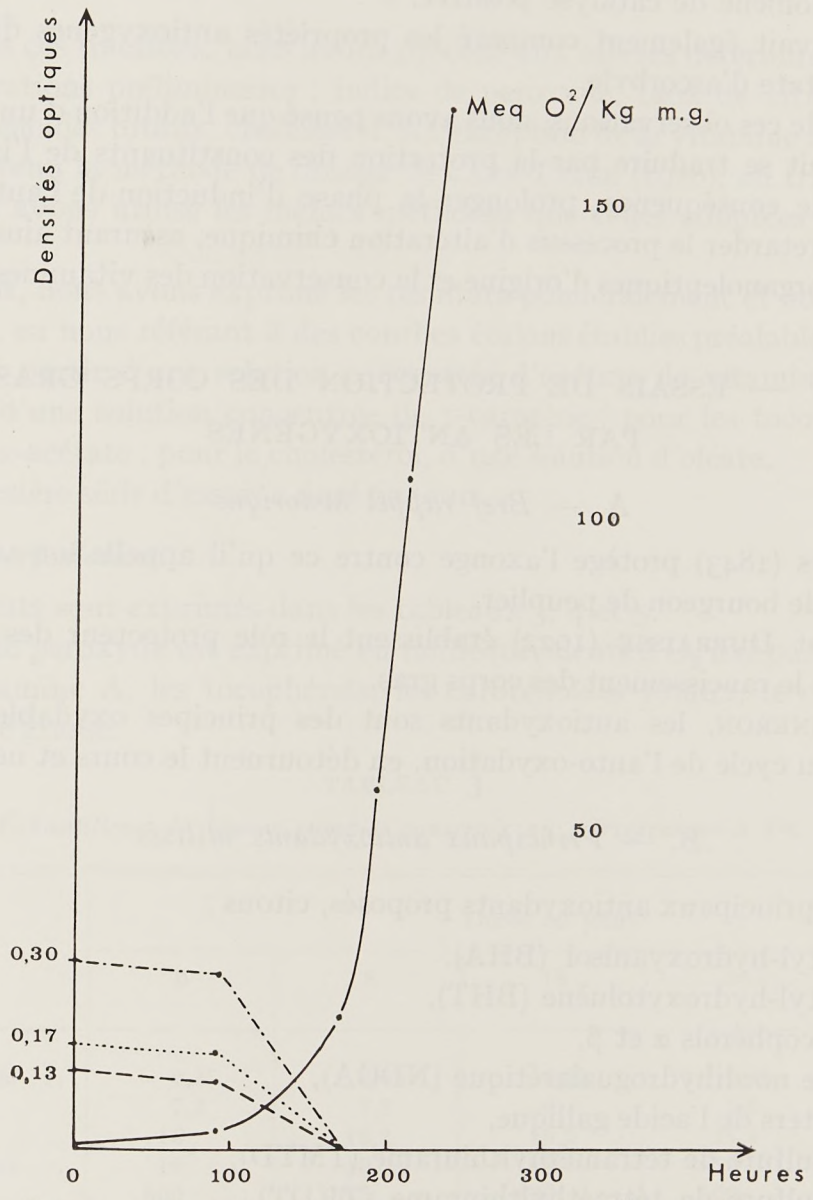


FIG. 1. — *Variation du taux des constituants de l'insaponifiable et de l'indice de peroxyde d'un beurre après 300 heures d'auto-oxydation à 40°C*

Dans le tableau 2, les constituants de l'insaponifiable sont exprimés en densités optiques aux longueurs d'onde indiquées précédemment, l'indice de peroxyde en milliéquivalents d'oxygène fixés par 1 kg de matière grasse.

Interprétation.

Pendant la phase d'induction, les liaisons éthyléniques à l'exception de celles des triènes conjugués et non conjugués subissent peu de modifications. Il en est de même du taux de cholestérol total. Au contraire, dans la phase d'auto-oxydation, la saturation des doubles liaisons est importante et nous constatons que le début de cette phase correspond à la disparition des principaux éléments de l'insaponifiable (vitamine A, caroténoïdes totaux, tocophérols).

La figure 1 illustre cette interprétation.

Hérisset (1954) avait déjà noté les propriétés antioxygènes du carotène. Il écrivait à propos de l'auto-oxydation du beurre :

« Pour une raison que je n'ai encore pu élucider, le carotène se détruit et on assiste au phénomène de catalyse positive. »

L'auteur avait également comparé les propriétés antioxygènes du carotène à celles du palmitate d'ascorbyle.

A la suite de ces observations, nous avons pensé que l'addition d'un antioxydant au beurre devait se traduire par la protection des constituants de l'insaponifiable et, par voie de conséquence, prolonger la phase d'induction de l'auto-oxydation, autrement dit retarder le processus d'altération chimique, assurant ainsi le maintien des propriétés organoleptiques d'origine et la conservation des vitamines.

II. — ESSAIS DE PROTECTION DES CORPS GRAS PAR LES ANTIOXYGÈNES

A. — *Bref rappel historique*

Deschamps (1843) protège l'axonge contre ce qu'il appelle son « érémacausie » par un extrait de bourgeon de peuplier.

Moureu et Dufraisse (1922) établissent le rôle protecteur des dérivés phénoliques contre le rancissement des corps gras.

Selon Vigneron, les antioxydants sont des principes oxydables qui, introduits au sein du cycle de l'auto-oxydation, en détournent le cours et neutralisent les effets.

B. — *Principaux antioxydants utilisés*

Parmi les principaux antioxydants proposés, citons :

le butyl-hydroxyanisol (BHA),
le butyl-hydroxytoluène (BHT),
les tocophérols α et β,
l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA),
les esters de l'acide gallique,
le disulfure de tétraméthylthiurame (TMTD),
le disulfure de tétraéthylthiurame (TEDT),
l'acide ascorbique (sous forme de palmitate).

Seule l'action de l'acide ascorbique sur la stabilité du beurre présentait pour nous de l'intérêt, car il est le seul antioxydant toléré par la législation française à la dose de 300 mg par kg de beurre (arrêté du 21 mai 1953).

III. — PROTECTION DU BEURRE PAR L'ACIDE ASCORBIQUE

Essais n° 1

Un échantillon de beurre est divisé en 2 parties.

L'une est conservée en l'état dans un réfrigérateur à usage domestique (8°C). L'autre subit une fusion douce à 40°C. La phase huileuse, séparée des fractions non lipidiques par centrifugation, est seule utilisée. Elle est divisée en deux fractions : à la première on incorpore du palmitate d'ascorbyle à la dose de 300 mg par kg, la deuxième fraction demeure en l'état.

De chacune d'elles, on fait 3 lots que l'on maintient à l'étuve respectivement à 18, 25 et 40°C.

Sur toutes ces fractions, nous avons procédé aux mêmes déterminations que lors de nos observations préliminaires : indice de peroxyde, taux de vitamine A, tocophérols, caroténoïdes totaux, cholestérol. A l'exception de la vitamine A pour laquelle nous avons retenu la méthode de dosage de CARR-PRICE (1926), au trichlorure d'antimoine, nous avons utilisé les mêmes méthodes que celles adoptées lors des essais préliminaires.

Cependant, nous avons exprimé les résultats pondéralement et non plus en densités optiques, en nous référant à des courbes étalons établies préalablement : pour la vitamine A, à partir d'une solution concentrée d'acétate de vitamine A ; pour les caroténoïdes, d'une solution concentrée de 1-carotène ; pour les tocophérols, d'une solution de *dl*-α-acétate ; pour le cholestérol, d'une solution d'oléate.

Cette première série d'essais a duré 60 jours.

Résultats et interprétation.

Les résultats sont exprimés dans les tableaux 3, 4 et 5.

L'indice de peroxyde est exprimé en milliéquivalents d'O_2 fixé par kg de matière grasse ; la vitamine A, les tocophérols, les caroténoïdes totaux, le cholestérol, en µg/g de matière grasse.

TABLEAU 3

Échantillons de beurre complet conservés au réfrigérateur à 8°C

	Durée en jours				
	0	8	18	36	60
Indice de peroxyde	0,25	0,35	0,25	0,25	0,5
Vitamine A	7,2	7,2	6	5,6	3,2
Tocophérols	16	15,2	15,2	14,4	12,8
Caroténoïdes totaux	10	10	10	10	9,8
Cholestérol	600	625	630	600	615

TABLEAU 4

Échantillons de matière grasse conservés à 18°C

(+) avec acide ascorbique
(—) sans acide ascorbique

		Durée en jours			
		8	18	36	60
Indice de peroxyde	(+)	0,35	1,1	1,3	1,8
	(—)	1,5	2	3,3	5
Vitamine A	(+)	5,6	5,6	4,4	1,6
	(—)	4,8	—	2,4	0
Tocophérols	(+)	12,8	8,8	5,6	4
	(—)	12	7,2	3,2	2
Caroténoïdes totaux	(+)	10	10,4	8,4	4,6
	(—)	10	10	4,6	0
Cholestérol	(+)	600	625	615	625
	(—)	600	625	620	620

TABLEAU 5

Échantillons de matière grasse conservés à 25°C

(+) avec acide ascorbique
(—) sans acide ascorbique

		Durée en jours			
		8	18	36	60
Indice de peroxyde	(+)	0,35	0,35	0,35	0,55
	(—)	2,3	3,1	4	8
Vitamine A	(+)	5,6	5,2	5,2	3,2
	(—)	5,2	4	2,8	1,2
Tocophérols	(+)	13,6	12,8	13,6	13,6
	(—)	11,2	10,4	9,6	0
Caroténoïdes totaux	(+)	10	9,6	9,6	9,6
	(—)	10,4	8,4	7,8	1,2
Cholestérol	(+)	625	630	620	625
	(—)	620	619	625	630

Dans les tableaux 4, 5 et 6, les signes (+) et (—) sont affectés respectivement aux échantillons avec (+) ou sans (—) palmitate d'ascorbyle.

Lors de ces essais, nous avons constaté une baisse de l'indice de peroxyde, après 60 jours à 40°C. Cette baisse doit être vraisemblablement attribuée à la décomposition partielle des peroxydes, selon le schéma proposé par POWERS (1949).

Les figures 2, 3, 4, 5 permettent de suivre la marche des phénomènes observés. Elles illustrent très nettement le rôle protecteur de l'acide ascorbique vis-à-vis des constituants de l'insaponifiable du beurre.

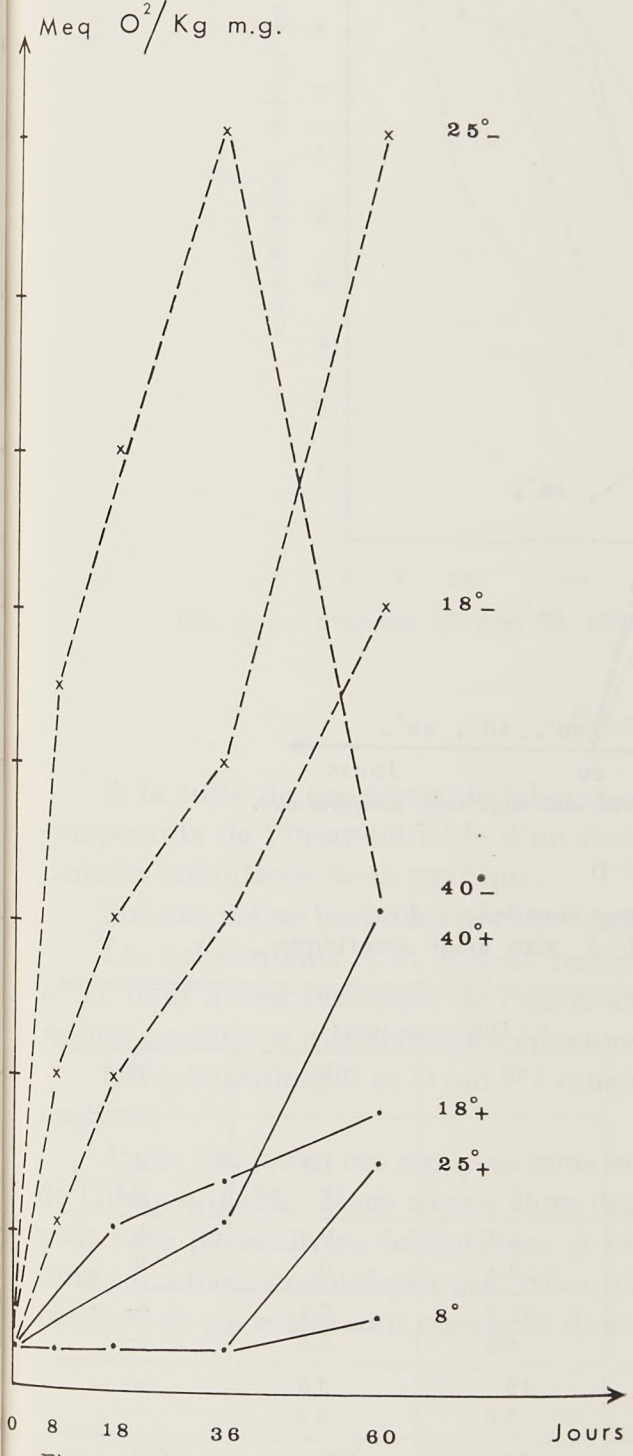


Fig. 2. — *Variation de l'indice de peroxyde aux différentes températures.*

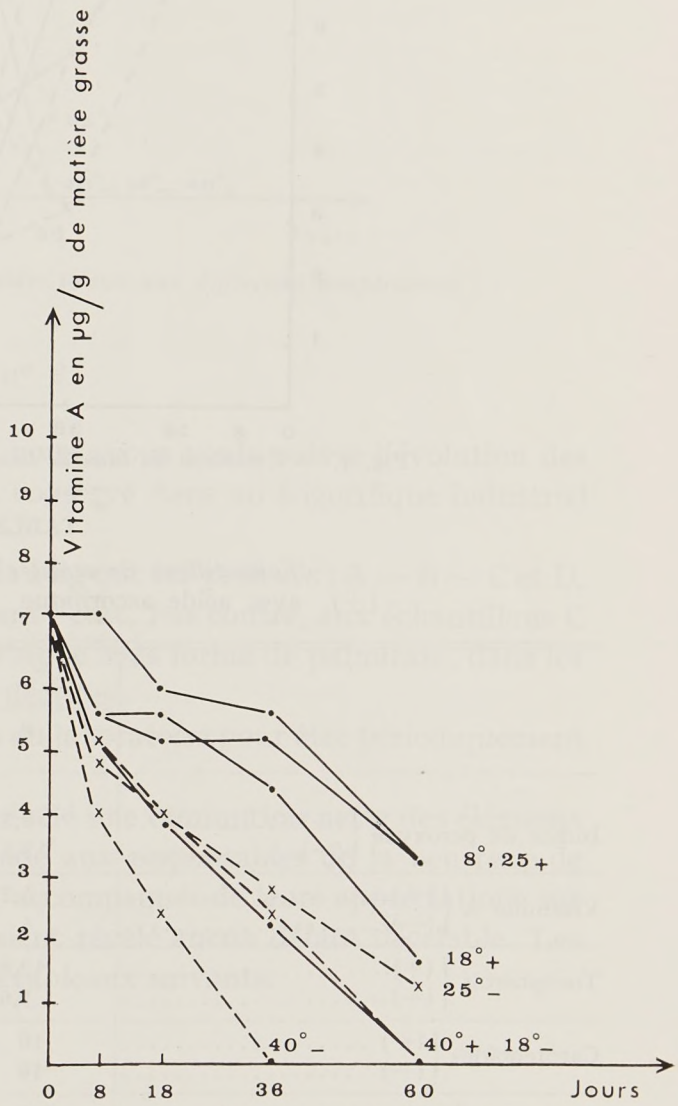


Fig. 3. — *Évolution du taux de vitamine A aux différentes températures.*

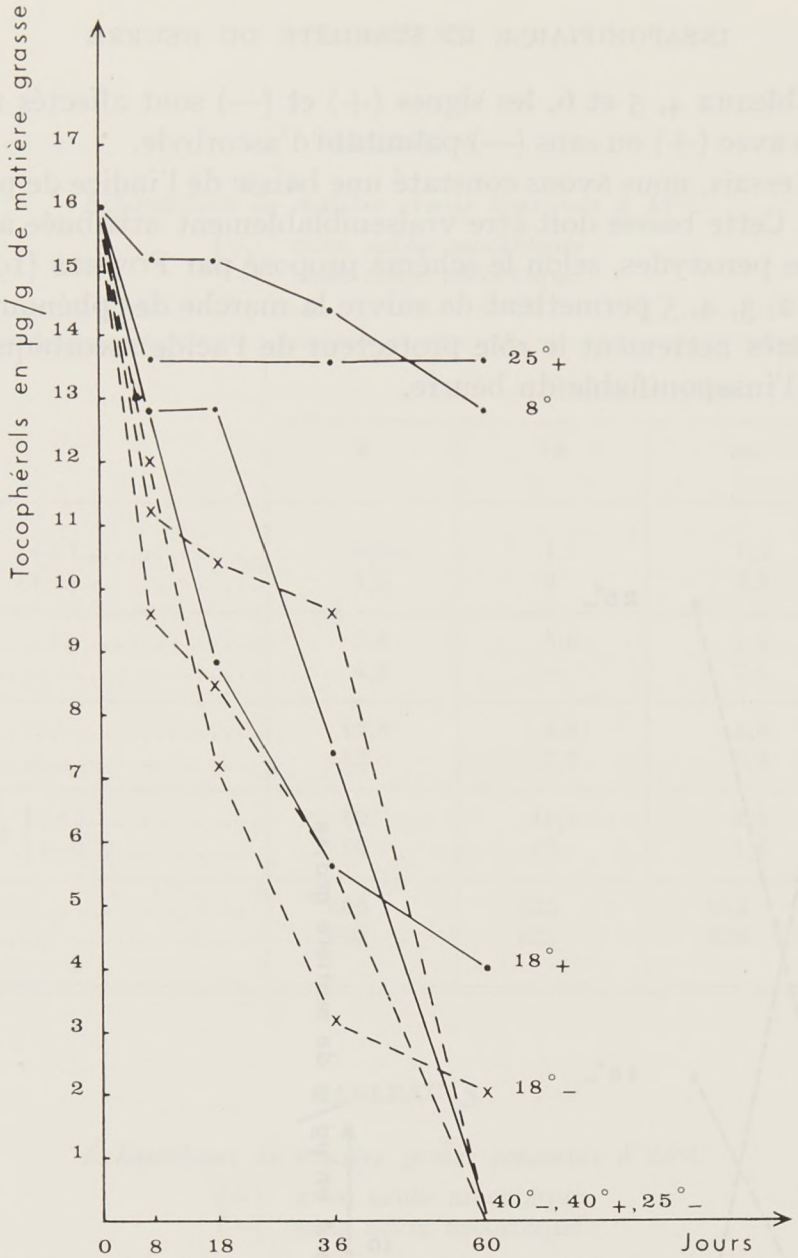


Fig. 4. — *Évolution du taux de tocophérols aux différentes températures.*

TABLEAU 6

Échantillons de matière grasse conservés à 40°C

(+) avec acide ascorbique (—) sans acide ascorbique

		Durée en jours			
		8	18	36	60
Indice de peroxyde	(+)	0,35	—	1,1	3
	(—)	3,5	6	8	3,1
Vitamine A	(+)	5,2	4	2,2	0
	(—)	4	2,4	0	0
Tocophérols	(+)	12,8	12,8	7,4	—
	(—)	9,6	8,5	5,6	—
Caroténoïdes	(+)	10	19	9,6	—
	(—)	10	5,6	3,2	—
Cholestérol	(+)	625	620	630	625
	(—)	615	625	620	630

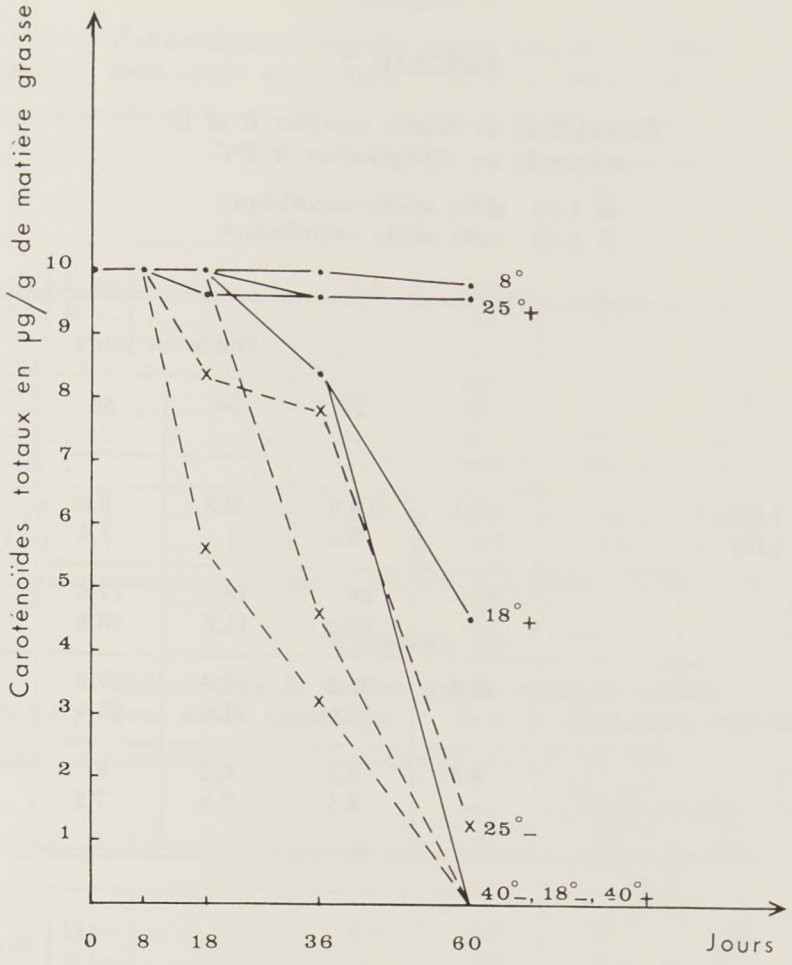


FIG. 5. — *Évolution du taux des caroténoïdes totaux aux différentes températures*

Essais n° 2

A la suite de ces essais de laboratoire, nous avons voulu suivre l'évolution des composants de l'insaponifiable d'un beurre conservé dans un frigorifique industriel dans les conditions de la pratique.

Sur une même barattée, 4 échantillons de 2 kg ont été prélevés : A — B — C et D.

Les échantillons A et B sont restés dans l'état. Par contre, aux échantillons C et D, nous avons incorporé de l'acide ascorbique sous forme de palmitate, dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites.

Les échantillons B et D ont été ramenés au laboratoire pour être périodiquement analysés.

Après 126 jours, ces analyses nous ont révélé une diminution nette des éléments de l'insaponifiable. Nous avons alors demandé aux responsables de la beurrerie de nous faire parvenir les échantillons A et C, accompagnés de leurs appréciations sur leurs caractères organoleptiques. Elles n'avaient révélé aucun défaut décelable. Les résultats de ces essais sont consignés dans les tableaux suivants.

TABLEAU 7

Échantillons de beurre complet B et D conservés au réfrigérateur à 8°C

D (+) avec acide ascorbique
B (—) sans acide ascorbique

		Durée en jours					
		0	26	56	86	126	206
Indice de peroxyde	D (+)	0,4	0,6	0,8	0,8	1,2	1,6
	B (—)	—	0,5	1	1,4	1,8	2,2
Vitamine A	D (+)	18	18	18	17,6	17,6	17
	B (—)	—	16,2	14,6	13,8	11	8,6
Tocophérols	D (+)	31,8	30,2	29,8	27,6	25	21,6
	B (—)	—	29,6	27,6	25,4	22	17
Caroténoïdes	D (+)	8,8	8,8	8,2	8	8,2	7
	B (—)	—	8,4	7,8	7,2	7,4	6,2

TABLEAU 8

Échantillons de matière grasse conservés à 18°C

D (+) avec acide ascorbique
B (—) sans acide ascorbique

		Durée en jours					
		0	18	56	86	126	206
Indice de peroxyde	D (+)	0,4	2,6	4,6	6,6	10,6	14,2
	B (—)	—	3	5,8	9,4	13	21,2
Vitamine A	D (+)	18	17,4	15,2	10	0	0
	B (—)	—	16,4	13	5	0	0
Tocophérols	D (+)	32	31	27,6	24,4	20,4	15
	B (—)	—	29	26,6	21,6	18	8
Caroténoïdes	D (+)	8,8	8,6	7	6,6	5	3
	B (—)	—	7,6	6,6	6	4,6	2,4

TABLEAU 9

Échantillons de matière grasse conservés à 25°C

D (+) avec acide ascorbique B (—) sans acide ascorbique

		Durée en jours					
		0	26	56	86	126	206
Indice de peroxyde	D (+)	0,4	0,6	0,8	1,4	2,4	3,2
	B (—)	—	1	1,8	2,4	2,7	4
Vitamine A	D (+)	18	17	15	13,4	—	7,6
	B (—)	—	16	14,4	12,4	10	3,8
Tocophérols	D (+)	32	29	28	24,2	22	16
	B (—)	—	28,6	26	22	19	12,4
Caroténoïdes	D (+)	8,8	8,8	8,4	7,8	7,4	6,6
	B (—)	—	8,2	7,6	7,2	6,2	5,6

TABLEAU 10

Échantillons de matière grasse conservés à 40°C

D (+) avec acide ascorbique B (—) sans acide ascorbique

		Durée en jours					
		0	26	56	86	126	206
Indice de peroxyde	D (+)	0,4	1,6	3	4,8	5,6	9
	B (—)	—	2,6	4,6	7	—	16
Vitamine A	D (+)	18	16,6	13,8	13	8,4	2,6
	B (—)	—	15	12	10	0	0
Tocophérols	D (+)	32	29,6	25	21	18	8,2
	B (—)	—	28	22,6	17	12	0
Caroténoïdes	D (+)	8,8	8,6	7	6,6	5	3
	B (—)	—	7,6	6,6	5	4,4	2

TABLEAU 11

Échantillons de beurre complet conservés à l'usine

C (+) avec acide ascorbique A (—) sans acide ascorbique

		Durée en jours					
		0	26	56	86	126	206
Indice de peroxyde	C (+)	0,4				1	1,2
	A (—)	—				1	2
Vitamine A	C (+)	18				17,6	17
	A (—)	—				16,8	16,5
Tocophérols	C (+)	32				30,2	29,6
	A (—)	—				29,8	26
Caroténoïdes	C (+)	8,8				8,2	7,6
	A (—)	—				7,6	6,6

Représentation graphique.

Pour représenter d'une manière aussi simple que possible ces résultats, nous avons adopté une ordonnée unique. Les différents éléments de l'insaponifiable sont exprimés en µg par gramme.

Par exemple les teneurs initiales de l'échantillon examiné, en tocophérols, en vitamine A, en caroténoïdes totaux, étaient respectivement de 32, 18 et 8,8 µg par gramme.

Au temps zéro, l'indice de peroxyde (IP) de ce même échantillon, exprimé en milliéquivalents d'O_2 par kg de matière grasse était de 0,4.

Les figures 6, 7, 8, 9 et 10 illustrent ces résultats.

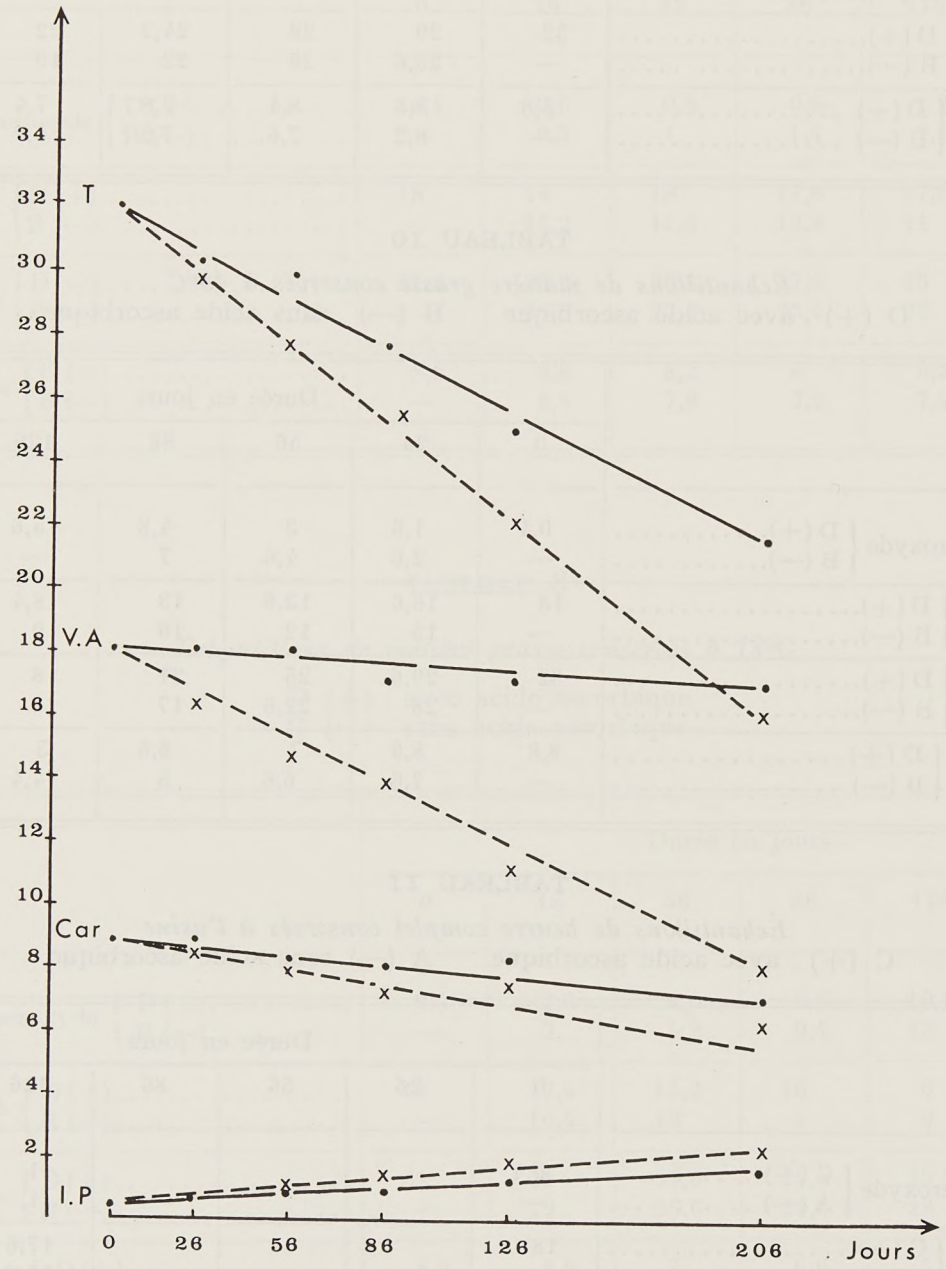


Fig. 6. — *Évolution des éléments de l'insaponifiable et de l'indice de peroxyde des échantillons B et D maintenus à 8°C*

T = Tocophérol
V. A. = Vitamine A
Car = Caroténoïdes totaux
} en µg/g matière grasse
IP = en méq. O_2/kg matière grasse

——— avec ac. ascorbique
– – – – sans ac. ascorbique

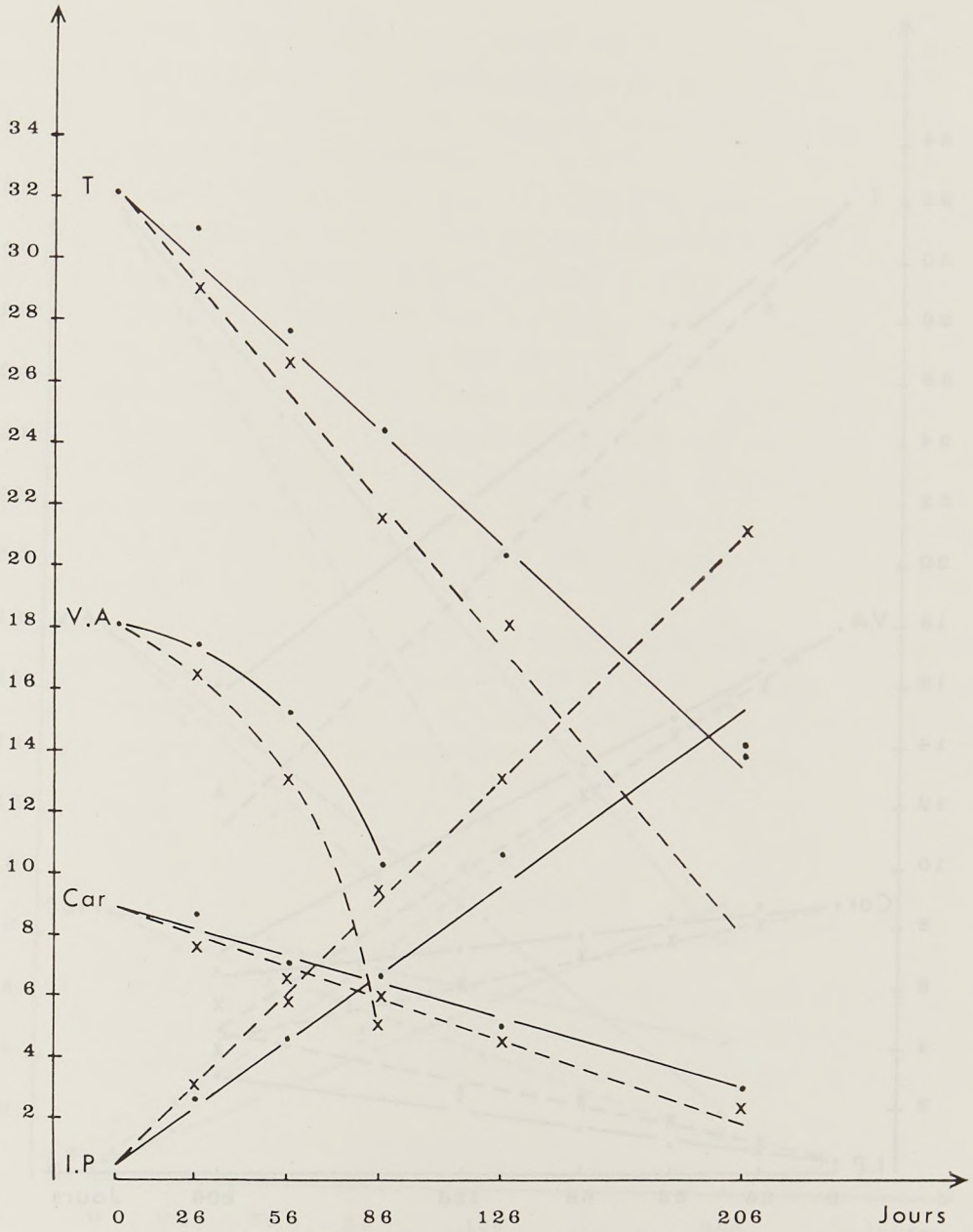


FIG. 7. — *Évolution des éléments de l'insaponifiable et de l'indice de peroxyde des échantillons maintenus à 18°C*

T = Tocophérol
V. A. = Vitamine A
Car = Caroténoïdes totaux
} en µg/g matière grasse
IP = en méq. O_2/kg matière grasse

——— avec ac. ascorbique
– – – – sans ac. ascorbique

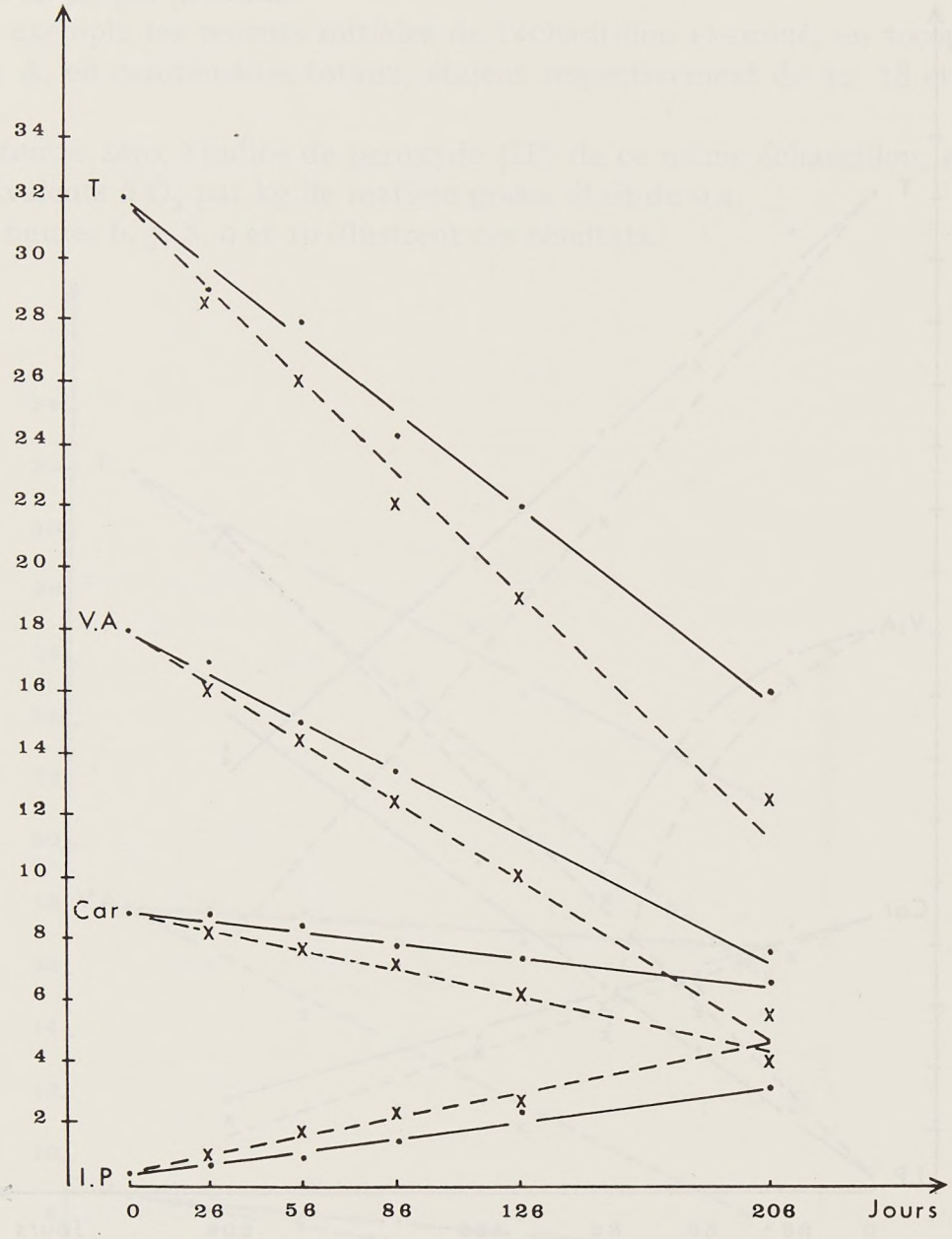


FIG. 8. — *Évolution des éléments de l'insaponifiable et de l'indice de peroxyde des échantillons maintenus à 25°C*

T = Tocophérol
V. A. = Vitamine A
Car = Caroténoïdes totaux
} en µg/g matière grasse
IP = en méq. O_2/kg matière grasse

——— avec ac. ascorbique
– – – – sans ac. ascorbique

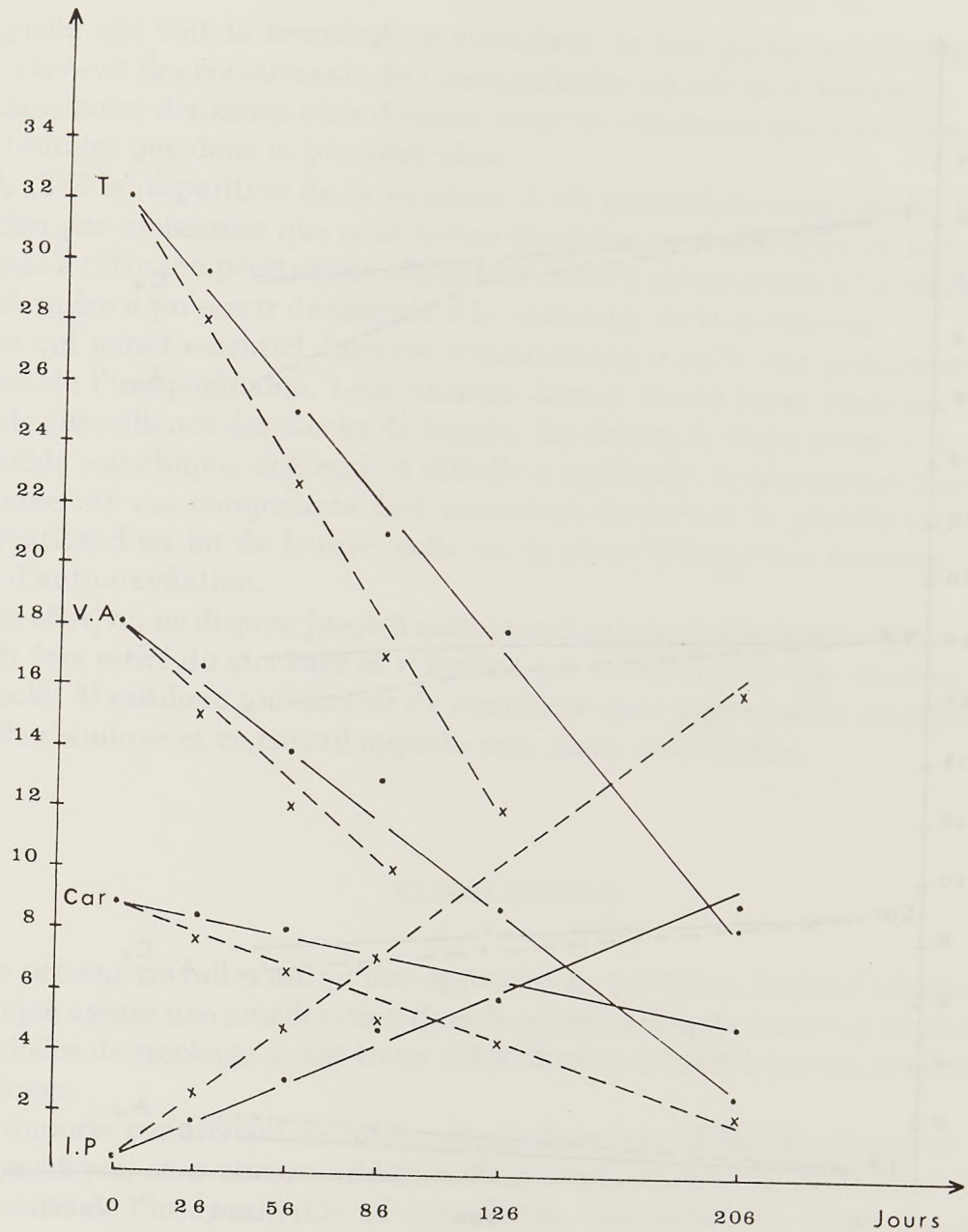


FIG. 9. — *Évolution des éléments de l'insaponifiable et de l'indice de peroxyde des échantillons maintenus à 40°C*

T = Tocophérol
V. A. = Vitamine A
Car = Caroténoïdes totaux
} en µg/g matière grasse
IP = en méq. O_2/kg matière grasse

——— avec ac. ascorbique
– – – – sans ac. ascorbique

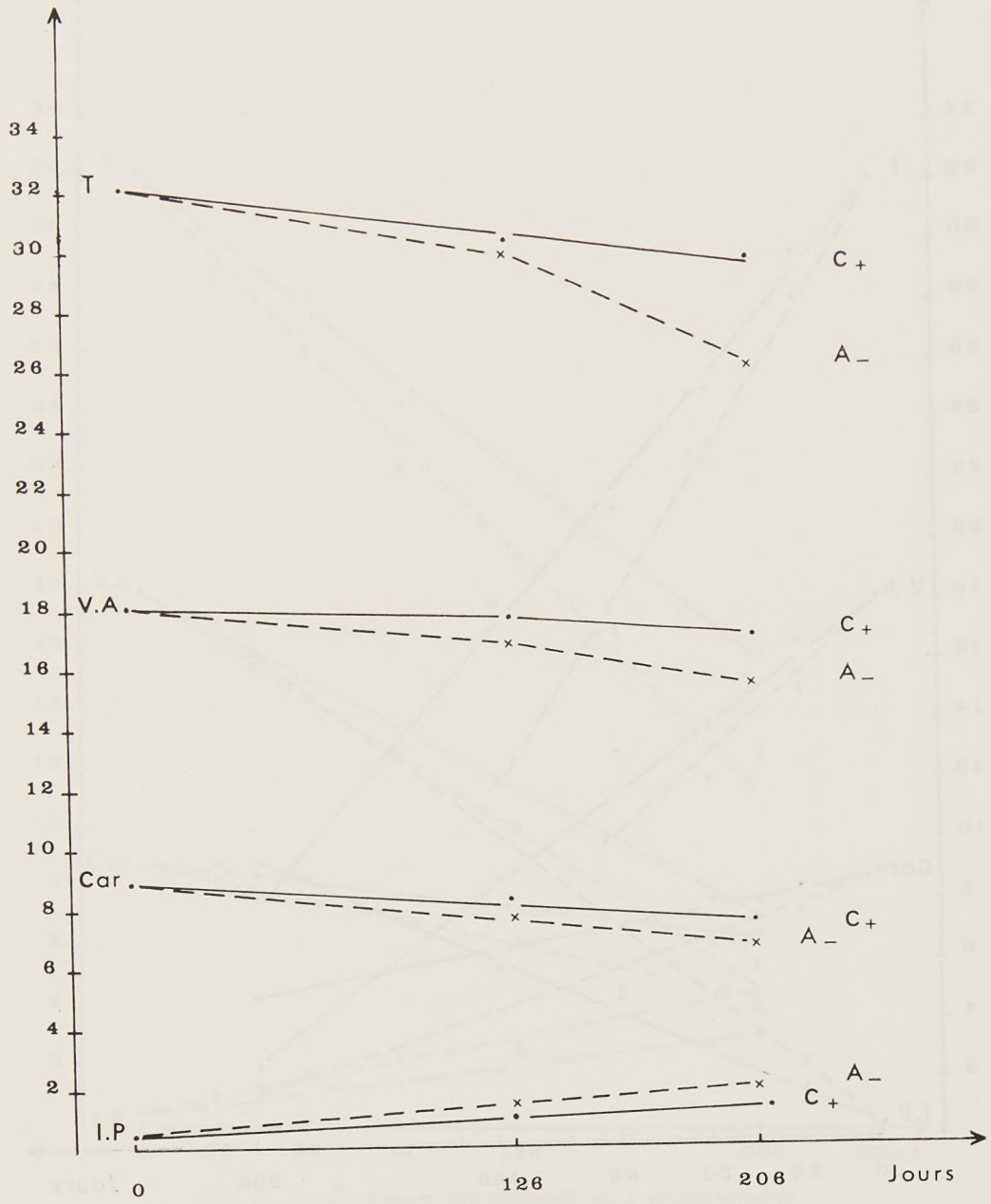


FIG. 10. — *Évolution des éléments de l'insaponifiable et de l'indice de peroxyde des échantillons A et C conservés à l'usine*

T = Tocophérol
V. A. = Vitamine A
Car = Caroténoïdes totaux
} en µg/g matière grasse
IP = en méq. O_2/kg matière grasse

——— avec ac. ascorbique
– – – – sans ac. ascorbique

IV. — DISCUSSION

Quelle que soit la température considérée, le rôle protecteur de l'acide ascorbique vis-à-vis des constituants de l'insaponifiable est mis en évidence.

Dans notre deuxième série d'essais, nous ne retrouvons pas à 40°C des variations aussi brutales que dans la première série.

A 18°C la disparition de la vitamine A est particulièrement rapide. Une contamination par moisissure que nous avons constatée peut expliquer ce fait. Comme il n'y a pas à cette température de séparation entre la phase grasse et la phase aqueuse, cette dernière a pu servir de support à la croissance de la moisissure.

Ce qui paraît essentiel dans ces constatations, c'est le rôle protecteur des constituants de l'insaponifiable. Leur examen dans le temps laisse entrevoir une possibilité de surveillance des stocks de beurre. En dehors de toute protection artificielle par l'acide ascorbique, onéreuse et difficile à appliquer, la diminution à un niveau à déterminer de ces composants doit permettre de prévoir la période critique de la conservation d'un lot de beurre, celle où, la phase d'induction terminée, débute la phase d'auto-oxydation.

En effet, on ne dispose jusqu'à maintenant que de la dégustation pour dire qu'un lot doit être retiré du stockage et remplacé par un autre dans une rotation surveillée des stocks. Il est donc souhaitable de remplacer cette appréciation subjective par un contrôle chimique et ce travail apporte sans doute une solution.

CONCLUSIONS

Le présent travail n'est qu'une approche du problème. Certes l'addition d'acide ascorbique assure une amélioration dans la conservation du beurre et la prolongation des périodes de stockage avant toute détérioration décelable par ses propriétés organoleptiques.

Il importe maintenant de suivre sur plusieurs lots de beurres conservés en entrepôt frigorifique, sans aucune addition d'antioxydant, le taux en dessous duquel les composants de l'insaponifiable ne doivent pas descendre pour éviter une altération appréciable à la dégustation.

Reçu pour publication en juillet 1969.

REMERCIEMENTS

Nous adressons nos remerciements aux Établissements Bridel (Retiers, Ille-et-Vilaine) qui ont gracieusement mis à notre disposition les échantillons.

Nous remercions également M. le Professeur Camus qui a bien voulu nous conseiller durant ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à M. R. Blais, Directeur, et à M. J. Keilling, Professeur, qui nous ont permis de réaliser ce travail dans les laboratoires de l'Institut national agronomique.

SUMMARY

THE EFFECT OF THE UNSAPONIFIABLE FRACTION ON THE STABILITY OF BUTTER. PRESERVATION OF BUTTER BY ASCORBIC ACID

In this paper stress is laid on the influence of the unsaponifiable fraction of butter on its stability. It appears that the disappearance of its principal constituent compounds coincides with the beginning of auto-oxidization of the fats.

Our experiments showed that the correct amount of ascorbic acid to be added to butter as an antioxidant depends on the level of the unsaponifiable fraction.

ZUSAMMENFASSUNG

DER EINFLUSS VOM UNVERSEIFBAREM FÜR DIE STABILISIERUNG DES BUTTERS UND SEIN SCHUTZ DURCH DIE ASKORBINSÄURE

In diesem Abschnitt haben wir den Einfluss von unverseifbarem des Butters für die Stabilisierung dieses Produkts unterstriechen.

Es hat erscheint dass die Verschwindung den prinzipielen Bestandteilein mit dem Anfang der Selbstoksidierung des Fettes übereinstimmt.

Unsere Experimenten zeigten dass die Rolle der hinzugefügter Askorbinsäure als das Antioksidans mit dem Bestandteilen von unverseifbaren gelegen ist.

RESUMEN

INFLUENCIA DEL INSAPONIFICABLE SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA MANTEQUILLA. SU PROTECTION CON EL ACIDO ASCORBICO

En este memoria, ensayemos de dar prueba que el insaponificable de la mantequilla aumenta la estabilidad del producto. Se puede notar que los elementos constituyentes del insaponificable desaparecen al empezar la autooxidación de la materia grasa.

El acido ascorbico añadido a la mantequilla da estabilidad a los componentes del insaponificable ; éstos últimos juegan el papel de antioxidantes.

RIASSUNTO

INFLUENZA DE L'INSAPONIFICABILE NELLA STABILITÀ DEL BURRO. LA SUA PROTEZIONE DA PARTE DELL'ACIDO ASCORBICO

Le nosore ricerche sottolineanno l'influenza dell' insaponificabile del burro nella stabilità di questo prodotto. Si è rivelato che la sparizione dei suoi principali elementi costitutivi coincideva con l'inizio dell'auto-ossidazione della materia grassa.

Le nostre prove hanno mostrato che la parte (azione) dell'acido ascorbico addizionato al burro come antiossigeno è situata al livello dei costituenti dell'insaponificabile.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CARR F. H., PRICE E. A., 1926. Colors reactions attribued to Vitamin A. *Biochem. J.*, **20**, 497.

DESCHAMPS J.-B., 1843. Mémoire sur les pommades et sur la cire. *J. Pharm. Chim.*, **4**, 201.

HÉRISSET A., 1954. *Influence de l'acide ascorbique et de ses dérivés sur l'autooxydation des lipides. 2° : Beurre.* Travaux du laboratoire de matière médicale et de pharmacologie de l'École de Plein exercice de Médecine et Pharmacie d'Angers.

LOFTUS-HILL G., THIEL C. C., 1945. The ferrithiocyanate method for estimating peroxyde in the fat of butter, milk and dried milk. *J. dairy Res.*, **14**, 340.

MACHEBŒUF M., DELSAL J.-L., 1942. Recherches sur le dosage de petites quantités de cholestérol libre ou estérifié. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **24**, 296.

MAHON J. H., CHAPMAN R. O., 1954. Detection of adulteration of butter with vegetable oils by means of tocopherol content. *Anal. Chem.*, **26**, 1955.

MOUREU C.-H., DUFRAISSE C.-H., 1922. Sur l'autooxydation. Les antioxygènes. *C. R. Acad. Sci.*, **174**, 258.

POWERS P. O., 1949. Mecanism of the oxydation of drying oils. *Industr. engng. Chem.*, **41**, 304.

SERVIGNE M., GUÉRIN de MONTGAREUIL P., PINTA M., 1950. Remarques sur le fractionnement chromatographique. Application à l'étude et au dosage de la Vitamine A. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **4**, 421.

VIGNERON M. *Autooxydation. Mesures de prévention. Antioxydants.* Société d'Éditions pharmaceutiques et scientifiques, 110, rue Édouard-Jacques, Paris, 14e.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (3), 187-198.

INFLUENCE DE L'ORIGINE DE LA THIAMINE (LEVURE OU MILIEU) SUR LA VITESSE DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

Andrée OURNAC

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

L'influence de la thiamine sur la vitesse de la fermentation alcoolique est encore controversée. Il apparaît qu'un facteur n'a pas été particulièrement étudié, c'est la teneur des levures en thiamine, teneur qui est très variable et qui doit certainement jouer un rôle important dans le comportement de la levure. On a repris cette étude en utilisant, en milieux synthétiques, des levures bien déterminées en quantité et en richesse en thiamine.

INTRODUCTION

En 1901, WILDIERS constate que les levures ne peuvent proliférer dans un milieu synthétique composé de C, d'N et de sels minéraux que lorsque on y ajoute un extrait de levures. On pensa alors que cet extrait renfermait un facteur indispensable à la croissance de la levure ; on l'appela : le « bios ».

Par la suite le « bios » fut reconnu comme constitué par 6 éléments différents : thiamine, biotine, inositol, acide nicotinique, acide pantothénique, pyridoxine. Le rôle de chaque élément, ainsi que la quantité à laquelle il agit, furent alors discutés.

En 1936, PETERS, ainsi que SCHERMAN et ELVEHJEM, signalent que la thiamine accélère la fermentation alcoolique et c'est à SHULTZ, ATKIN et FREY (1937) que revient le mérite d'avoir utilisé cette propriété pour établir un dosage quantitatif. Les conditions de fermentation sont les suivantes : levures de boulangerie comme agent de fermentation, pH égal à 5, mesure effectuée pendant le début de la fermentation.

Mais la relation entre la stimulation et la quantité de thiamine n'est linéaire qu'au début de la fermentation et entre deux limites faibles et très voisines, 10 à 50 µg/l. Pour des doses de thiamine supérieures, l'effet stimulateur s'atténue jusqu'à

disparaître. Les limites ont par la suite été portées entre 5 et 10 µg/l, par ATKIN, SCHULTZ et FREY (1939), et entre 2 et 7 µg/l par Y. ARMAND (1942).

Pour LOCHHEAD et LANDERKIN (1941), la réponse de nombreuses souches de *Saccharomyces cerevisiae* à la thiamine peut être très différente ; certaines souches peuvent être stimulées tandis que d'autres sont inhibées.

JACKSON et KILKENNY (1951) observent que la réponse d'une souche particulière de levure à la thiamine est directement proportionnelle à la quantité de ce corps quand il est présent à des concentrations inférieures à 10^{-8} M, et ils estiment que chaque division de cellule demande $4{,}5 \times 10^4$ molécule de thiamine.

Mlle LAFOURCADE (1954), dans une étude sur les besoins en facteurs de croissance des levures du Médoc et de Saint-Émilion, détermine l'influence de chaque facteur sur la croissance et aussi sur le pouvoir fermentaire de ces levures. Les levures *Saccharomyces ellipsoideus* sont parfaitement capables de se multiplier dans un milieu absolument privé de vitamines ; cependant elles sont plus ou moins affectées dans leur fermentation par l'absence d'acide panthoténique surtout, et de thiamine à un degré moindre.

KIRSOP, en 1955, étudie, lui aussi, la croissance d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* qu'il fait pousser dans des milieux synthétiques renfermant tous les éléments du bios sauf un alternativement. Il trouve que la levure n'a qu'un besoin partiel en thiamine ; en son absence son développement est environ les 3/4 de celui qui se produit en présence de tous les éléments.

De toute façon, d'après MORRIS (1958), les constituants du « bios » de WILDIERS sont actifs à des doses étonnamment faibles ; par exemple, une levure qui ne se développe pas en l'absence de certains éléments du « bios » peut se développer avec un grand rendement pour des additions de ces éléments de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-9}.

L'effet du « bios » sur les levures est relatif à leur croissance, mais aussi à leur vitesse de fermentation qui, elle, est subordonnée à la croissance.

D'autre part, RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD (1952-1953), CASAS LUCAS (1954), constatent que la thiamine ajoutée à des jus de raisin frais accélère leur fermentation, tandis que DUPUY et FLANZY (1954), DUPUY, NORTZ et PUISAIS (1955), FLANZY et OURNAC (1963) n'observent pratiquement pas de variation de la vitesse de fermentation de jus frais après addition de thiamine.

Pour bien préciser l'action de la thiamine sur la fermentation, nous avons considéré parallèlement des milieux synthétiques de composition simple, mais dans lesquels la levure trouve les éléments essentiels à sa multiplication et à son activité fermentaire, et des jus de raisins frais. L'ensemencement est réalisé avec différentes souches de *Saccharomyces ellipsoideus*.

PROTOCOLE DES ESSAIS

Le milieu synthétique utilisé est sensiblement identique à celui de Mlle LAFOURCADE (1954) ; nous remplaçons uniquement l'acide citrique par l'acide tartrique à la dose où il se trouve dans les jus de raisins frais, c'est-à-dire 5 g/l, le pH final est alors aux environs de 3, le sucre présent, soit 170 g/l, correspond à un degré alcoolique en puissance voisin de 10.

Le milieu de base est totalement dépourvu de thiamine ; on en ajoute par la suite à la dose que l'on désire expérimenter, soit : 50, 100, 200 et 600 µg/l. Les jus de raisins frais sont obtenus par foulage et pressurage immédiat des fruits frais (cépage *Carignan rouge*) récoltés au Domaine

expérimental de l'I. N. R. A. (Pech-Rouge). Leur degré alcoolique en puissance se situe autour de 10. Les milieux (1 litre pour chaque essai) sont ensemencés au moyen de levains de différentes souches de *Saccharomyces ellipsoideus* en pleine activité à raison de 2 ou 10 millions de germes par ml. Le levain est élaboré à partir de levures isolées sur milieu solide et mises à fermenter dans un jus de raisin blanc, sulfité-désulfité et enrichi en phosphate de NH_4 (diammonique, 100 mg/l) et en « yeast-extract » (Difco) (500 mg/l). Les souches de *S. ellipsoideus* utilisées ont été obtenues à partir de divers jus de raisins frais en fermentation.

Avant d'adopter ces conditions, nous avons examiné l'influence de la teneur en thiamine du levain ; pour cela nous avons obtenu des levains de richesse en thiamine variée, par culture sur milieux différemment enrichis en ce corps.

Les essais sont pesés tous les jours, ce qui permet d'établir les courbes de perte de poids, exprimée en g/l, qui représentent l'allure des vitesses de fermentation, la perte de poids étant due au dégagement du CO_2. Dans la suite du mémoire, c'est à de telles courbes que l'on fera allusion.

RÉSULTATS

1. *Influence de la teneur en thiamine des levures sur la vitesse de fermentation*

On ne peut dire qu'une levure a une teneur en thiamine bien déterminée et caractéristique ; cette teneur dépend de la richesse en thiamine du milieu liquide dans lequel elle s'est développée.

En utilisant des milieux de culture additionnés de : 0, 100, 500, 1 000, 2 000, 3 000, 4 000 et 5 000 µg de thiamine par litre, on a obtenu des levures en pleine activité

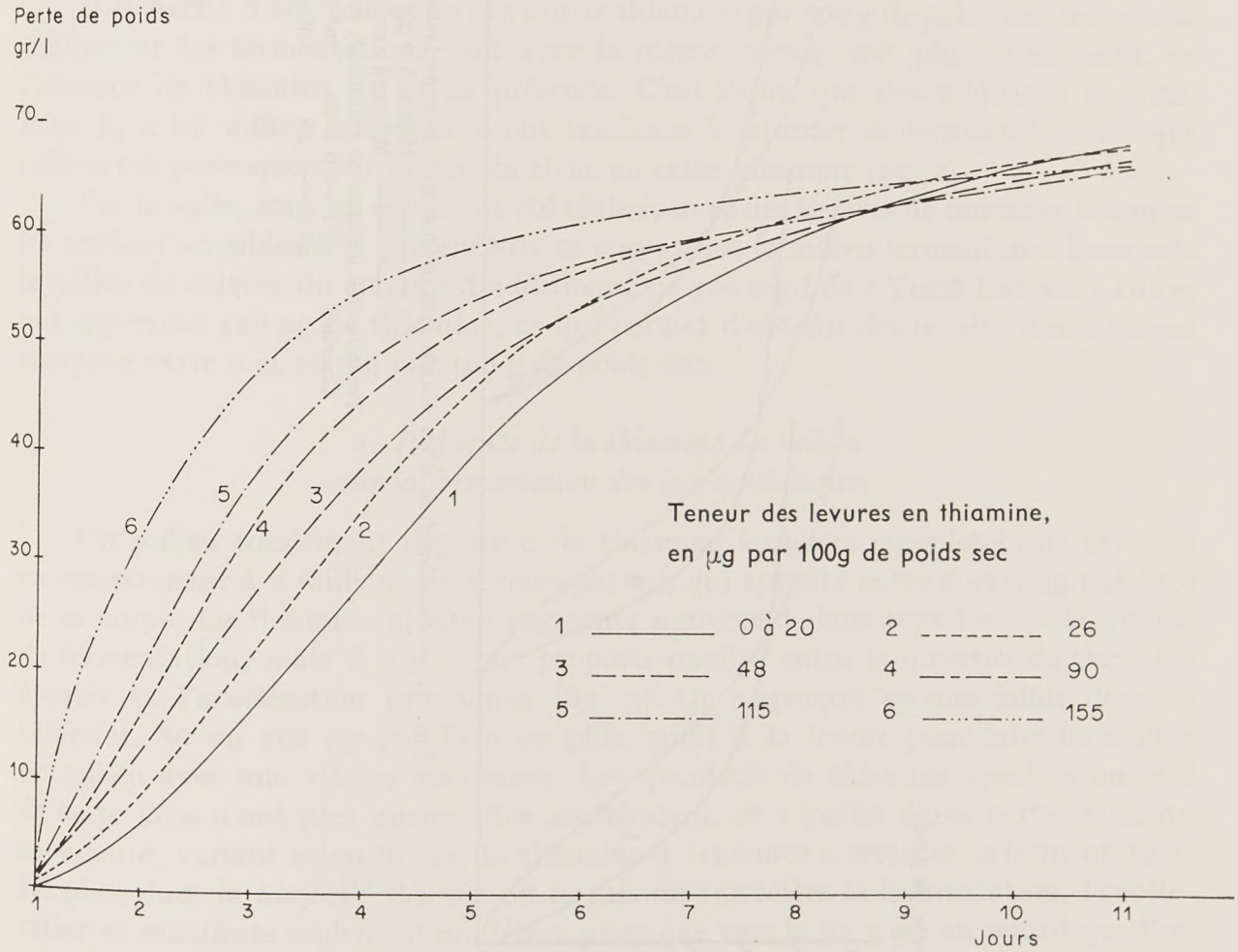


FIG. 1. — *Fermentation d'un milieu synthétique dépourvu de thiamine par des levures de différentes teneurs en thiamine.*

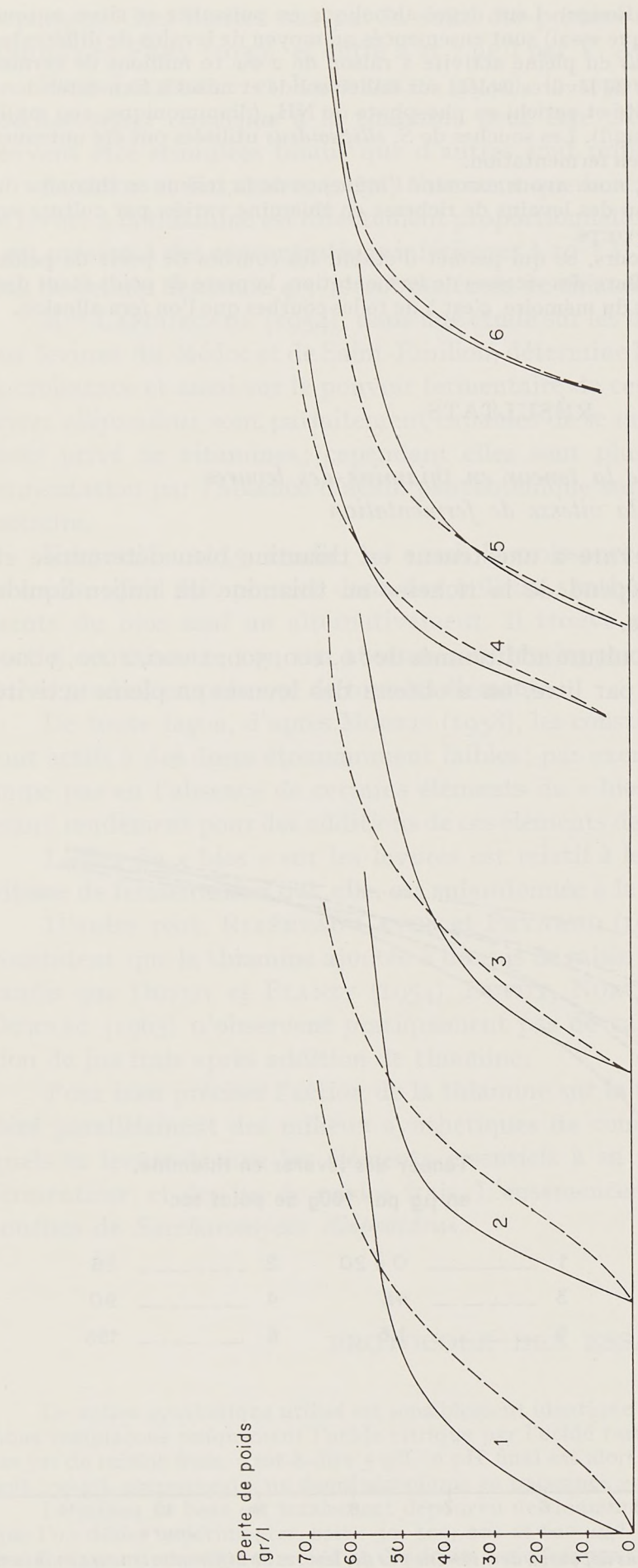


FIG. 2. — *Fermentation d'un milieu synthétique, avec et sans thiamine, par des levures de différentes teneurs en thiamine.*
— — — — Milieu à 0 µg de thiamine/l
———— Milieu à 100 µg de thiamine/l
Teneurs des levures en thiamine, en µg/100 g de poids sec.
Courbes n° 1 — 0 à 20 n° 3 — 48 n° 5 — 115
n° 2 — 26 n° 4 — 90 n° 6 — 155

fermentaire renfermant respectivement : 3, 9, 20, 26, 48, 90, 115 et 155 mg de thiamine pour 100 g de poids sec, et qui apportent pour un ensemencement à 2 millions de germes par ml : 1, 5, 8, 14, 26, 43, 69 et 86 µg de thiamine par litre. Avec ces différents levains on a ensemencé, simultanément avec chacun d'eux, 2 jus synthétiques, l'un dépourvu de thiamine, l'autre en renfermant 100 µg/l. Dans ces conditions on a constaté :

a) la fermentation d'un milieu dépourvu de thiamine est d'autant plus rapide que le levain utilisé est riche en ce corps. Cependant l'accroissement de la vitesse de fermentation n'apparaît qu'à partir d'une teneur de 20 mg/100 g de poids sec. Les levures renfermant entre 0 et 20 mg de thiamine par 100 g de poids sec provoquent des fermentations de vitesses identiques (fig. 1).

b) avec des levains de teneur en thiamine inférieure à 115 mg pour 100 g de poids sec, la vitesse de la fermentation est accrue par la présence de thiamine dans le milieu fermentaire. Mais la thiamine n'accélère la fermentation qu'à ses débuts, par la suite elle la freine. Il faut donc distinguer deux parties dans la courbe représentant l'allure de la fermentation : une première partie, au cours de laquelle la vitesse de fermentation du milieu thiaminé est supérieure à celle du milieu sans vitamine, et une deuxième partie où c'est l'inverse qui se produit. La durée de la période d'accélération varie avec la richesse du levain en thiamine : elle diminue quand cette richesse augmente, pour devenir nulle à partir d'une richesse voisine de 115 mg pour 100 g de poids sec (fig. 2).

c) à partir d'une teneur de 115 mg de thiamine par 100 g de poids sec, les levains conduisent les fermentations, soit avec la même vitesse, soit plus rapidement, en l'absence de thiamine qu'en sa présence. C'est-à-dire que des additions de vitamine B_1 à un milieu fermentaire ont tendance à retarder sa fermentation lorsque celle-ci est provoquée par un levain riche en cette vitamine (fig. 2).

Par la suite, tous les essais ont été réalisés avec des levures de teneur en thiamine les rendant sensibles à la présence de ce corps dans le milieu fermentaire. Pour cela le milieu de culture du levain est additionné de 500 mg/l de « Yeast Extract » Difco, qui apportent 120 µg de thiamine, ce qui permet d'obtenir des levains d'une teneur comprise entre 6 et 10 mg par 100 g de poids sec.

2. *Influence de la thiamine du milieu sur la fermentation des jus synthétiques*

Un milieu totalement dépourvu de thiamine fermente complètement avec un ensemencement à 2 millions de germes par ml, qui apporte entre 2 et 6 µg par litre de ce corps. La thiamine ajoutée augmente nettement dans tous les cas la vitesse de fermentation, mais il n'y a pas proportionnalité entre la quantité de thiamine ajoutée et l'accélération provoquée (fig. 3). On s'aperçoit qu'une faible dose de thiamine, 50 ou 100 µg par litre au plus, suffit à la levure pour faire fermenter un milieu avec une vitesse maximum. Les quantités de thiamine ajoutées au-delà de cette dose n'ont plus aucun effet accélérateur, et à partir d'une certaine limite supérieure, variant selon le cas, la thiamine a tendance à retarder la fermentation. De plus, dans la majorité des cas où la thiamine accélère la fermentation, l'accélération se manifeste seulement au début, alors que vers la fin c'est un retard que l'on constate (fig. 4).

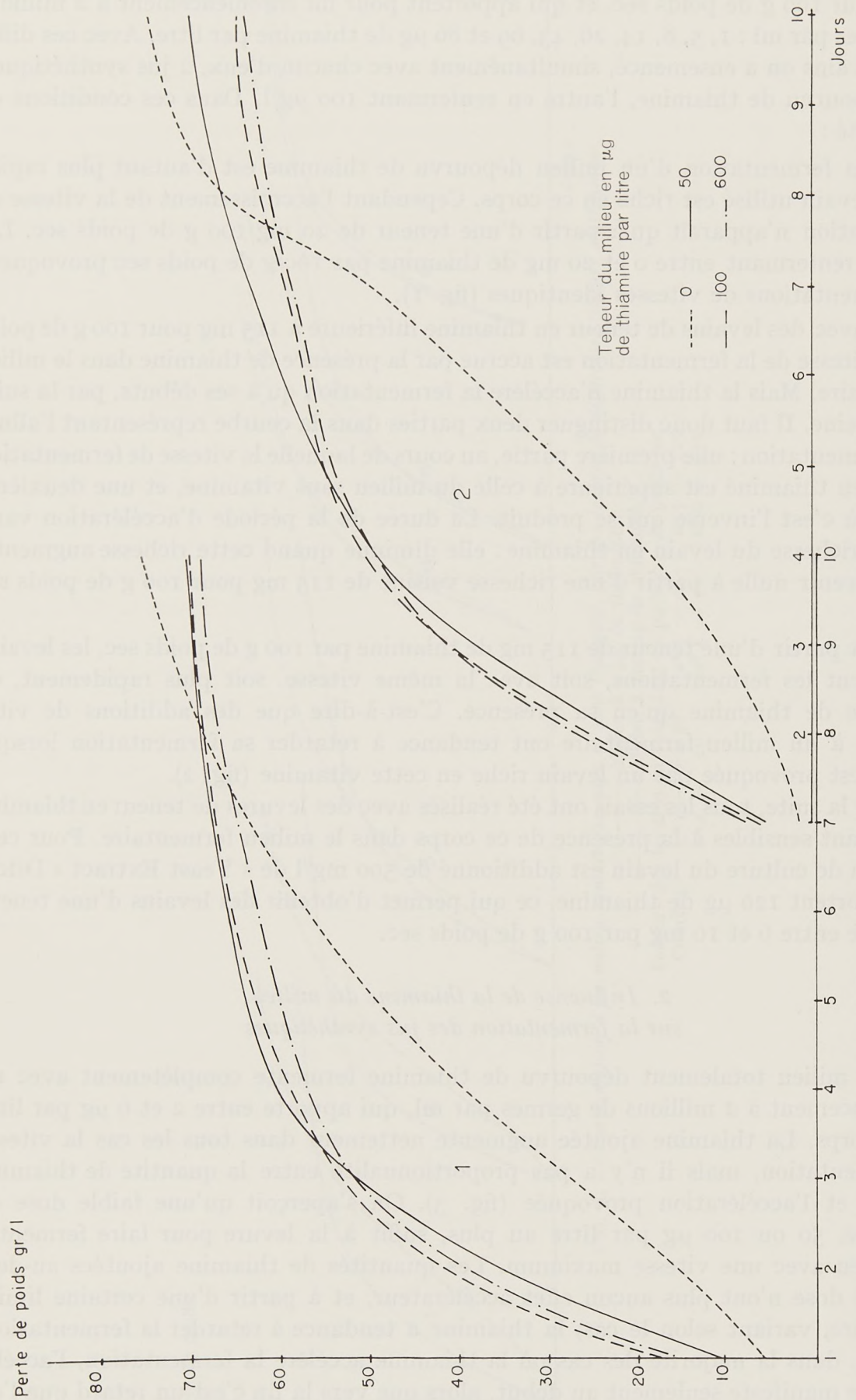


FIG. 3. — *Influence de la thiamine sur la vitesse de fermentation d'un milieu synthétique.*
Courbes nº 1. — Ensemencement à 2. 10^6 germes/ml
Courbes nº 2. — Ensemencement à 10. 10^6 germes/ml

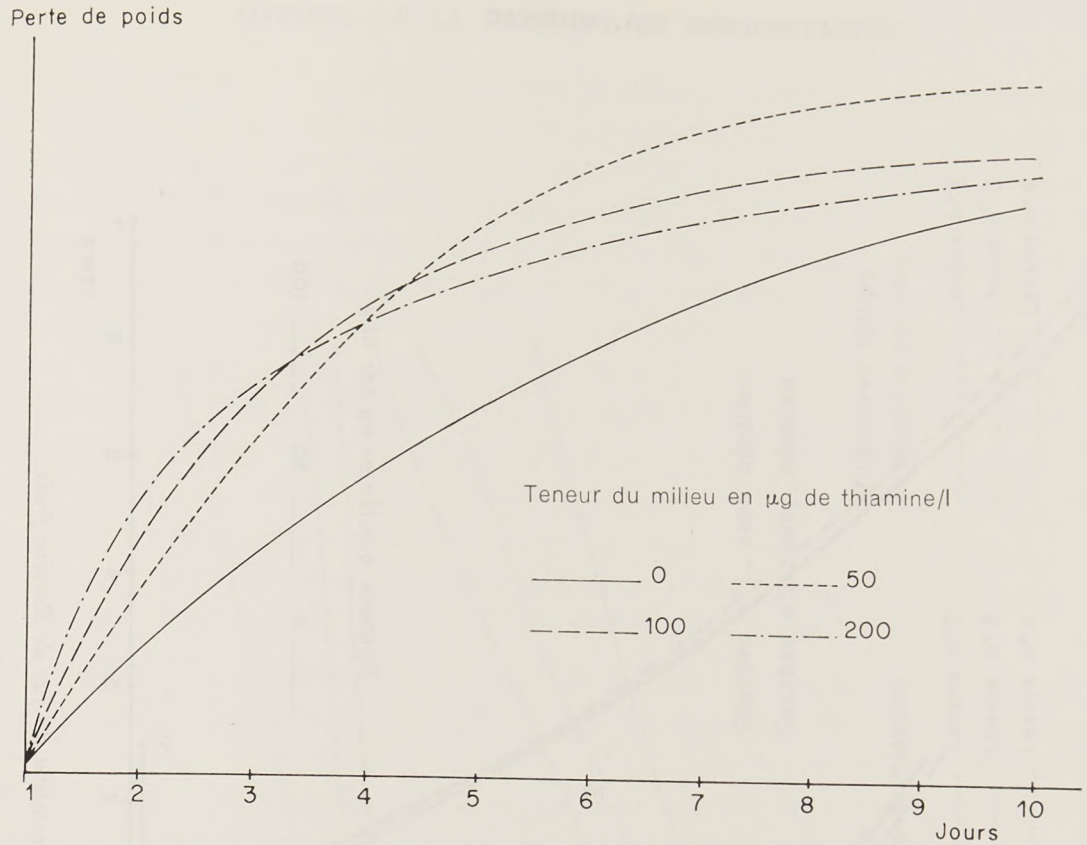


FIG. 4. — *Influence de la thiamine sur la vitesse de la fermentation. Courbes théoriques.*

TABLEAU I

Thiamine élaborée par S. ellipsoideus
pendant la fermentation sur milieu synthétique dépourvu de thiamine

Levure		Poids des lies (g/l)	Thiamine des lies (µg/100 g de poids) frais	Thiamine des lies (µg/l de vin)	Thiamine du vin (µg/l)	Thiamine vin + lies (µg/l)	Thiamine de l'ensemencement (µg/l)	Thiamine élaborée (µg/l)
Souche	Dose d'ensemencement ($\cdot 10^6$/ml)							
N° 1	2	8,93	185	16,5	21	37,5	4,5	33
N° 1	2	7,98	150	12	34	46	5	41
N° 2	2	10,81	92,5	10	20	30	5	25
N° 2	2	8,65	312	17	5	22	5	17
N° 3	2	11,2	170	20	24	44	2	42
N° 4	2	10,3	204	21	5	26	2	24
N° 1	2	14,65	205	30	8	3,8	6	32
	10	16,16	185	30	15,5	45,5	30	15,5
N° 2	2	7,94	126	10	20	30	5	25
	10	10,79	93	10	25	35	25	10
N° 5	2	11,85	175	21	15	36	2	34
	10	10,2	100	11	14	25	10	15
N° 3	10	12,8	268	35	14	49	16	33

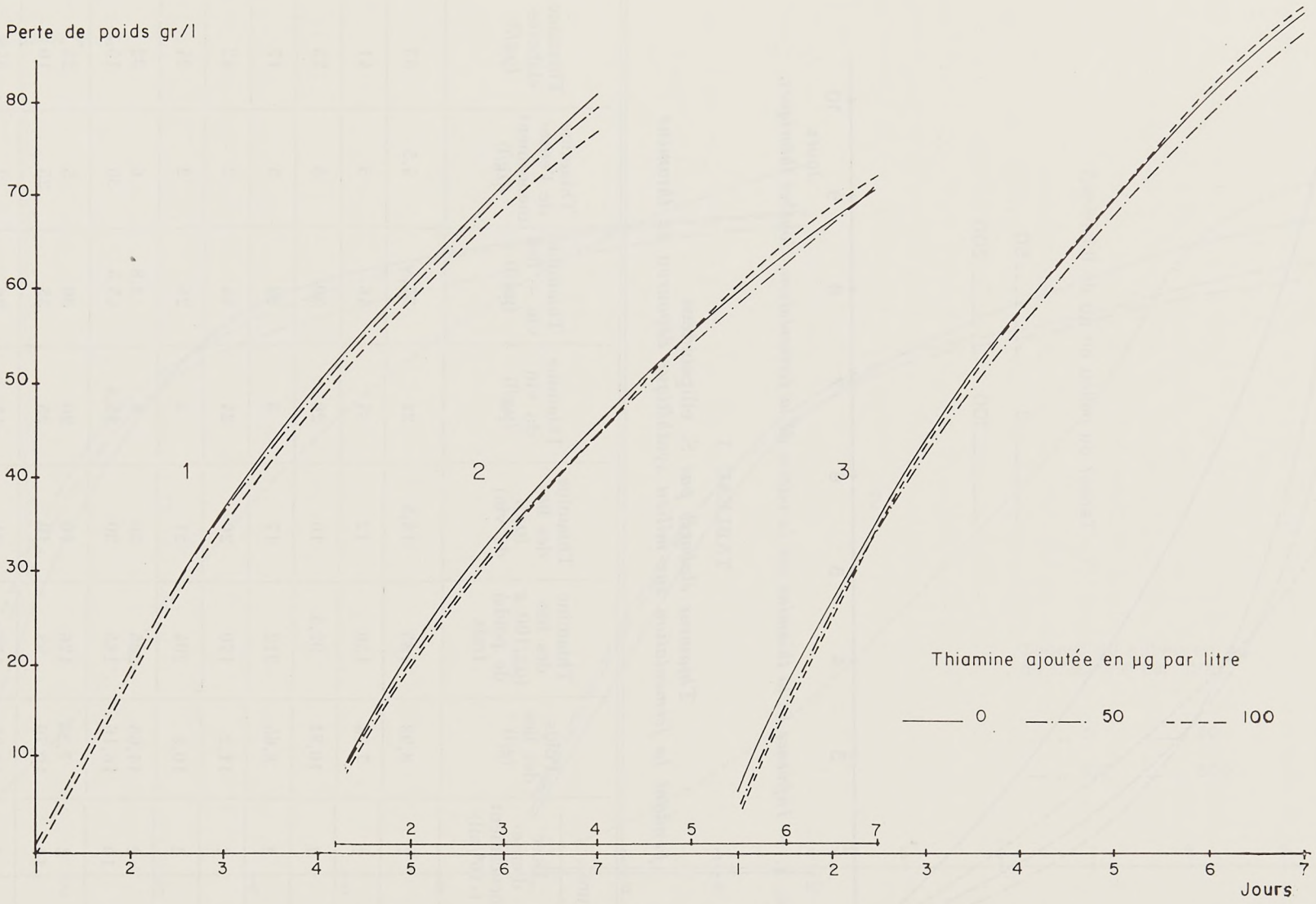


FIG. 5. — *Influence de la thiamine sur la vitesse de la fermentation du jus de Raisins frais.*
Courbes nº 1 sans ensemencement
nº 2 ensemencé avec levure nº 1 à raison de 10^7 germes/ml
nº 3 ensemencé avec levure nº 2 à raison de 10^7 germes/ml

Perte de poids

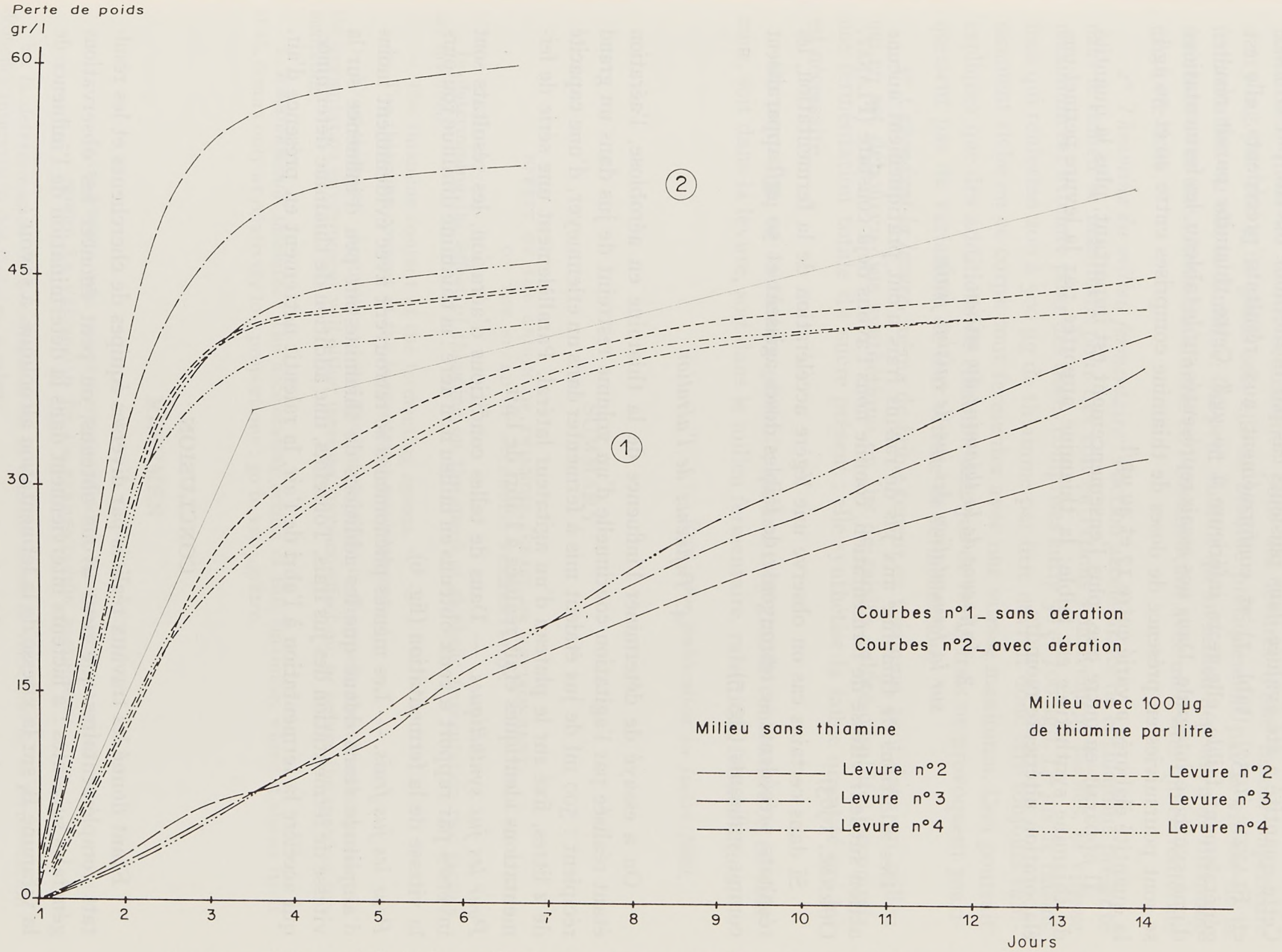


FIG. 6. — *Influence de l'aération sur la vitesse de fermentation d'un milieu synthétique avec et sans thiamine*

Dans les milieux synthétiques dépourvus de thiamine, la levure en élabore une certaine quantité qui lui permet de mener à bien la fermentation alcoolique des sucres. Cette quantité a été évaluée dans plusieurs cas par la méthode décrite par OURNAC et FLANZY (1957) (tabl. 1) et conformément aux résultats précédents, elle est généralement faible, elle reste inférieure à 50 µg/l. Cette thiamine paraît résulter d'une synthèse intégrale. Dans nos essais représentés sur le tableau, les fermentations se sont poursuivies en présence de doses de thiamine comprises entre 20 et 50 µg/l; la quantité élaborée a varié entre 17 et 40 µg/l.

Il apparaît en outre que, plus l'ensemencement est important, plus la quantité de thiamine synthétisée est faible; la thiamine apportée par la levure permet une élaboration ultérieure moindre.

3. *Influence de la thiamine du milieu sur la fermentation des jus de raisins frais*

Des additions de thiamine aux jus de raisins frais n'ont pratiquement aucune action sur leur vitesse de fermentation, comme nous l'avons déjà constaté (FLANZY, OURNAC, 1963).

Si dans certains cas on observe une légère accélération de la fermentation, les résultats précédents se retrouvent : de faibles doses agissent et 50 µg/l apparaissent comme suffisants (fig. 5).

4. *Influence de l'aération*

On a essayé de déterminer l'influence de la thiamine en aérobiose, l'aération étant réalisée par l'agitation continuelle d'un volume restreint de jus dans un grand récipient : 500 ml de jus étaient mis à fermenter dans un erlenmeyer, d'une capacité de 2 litres, fixé sur le plateau d'un agitateur latéral. Parallèlement une série de fermentations identiques était réalisée à l'abri de l'air.

Pour les jus synthétiques. — Dans de telles conditions d'aération, les résultats sont inversés par rapport à ceux obtenus en milieu non aéré : la thiamine diminue toujours la vitesse de la fermentation (fig. 6).

Pour les jus frais. — Les mêmes phénomènes se retrouvent avec évidemment moins d'amplitude étant donné que les additions de thiamine ont peu d'influence sur la vitesse de fermentation des jus frais. Toutefois, une addition de thiamine déterminée, qui accélère la fermentation à l'abri de l'air, la ralentit nettement en présence d'air.

CONCLUSION

Étant donné les travaux réalisés par diverses équipes de chercheurs et les résultats complémentaires que nous avons obtenus, on peut énoncer les observations générales suivantes : 2 facteurs interviennent dans la détermination de l'influence de la vitamine B_1 sur la vitesse de la fermentation alcoolique, à savoir :

— la teneur en thiamine des agents de la fermentation ;
— la teneur en thiamine du milieu fermentaire.

1° *Thiamine de la levure* : pour des levures d'une teneur en thiamine inférieure à 115 mg par 100 g de poids sec, la thiamine présente dans le milieu accélère la fermentation, mais au début seulement ; pour des levures d'une teneur supérieure à 115 mg par 100 g de poids sec, elle ne modifie pratiquement pas la vitesse de la fermentation ou elle la diminue. On peut obtenir qu'un milieu dépourvu de thiamine fermente avec une vitesse maximum en l'ensemençant avec un levain qui en renferme une forte dose.

2° *Thiamine du milieu fermentaire* : l'action accélératrice de la thiamine présente dans le milieu se manifeste pour des concentrations relativement faibles, la vitesse maximum est atteinte pour des doses comprises entre 50 et 100 µg/l. Le jus de raisins frais qui renferme 200 à 500 µg de thiamine par litre devrait donc être toujours suffisamment riche en ce corps pour fermenter avec une vitesse maximum. Ceci pourrait expliquer que des additions de thiamine aux jus de raisin frais ne provoquent pratiquement pas de variations de leur vitesse de fermentation.

3° *Cependant la levure*, même de faible teneur en thiamine, peut dans un milieu qui en est dépourvu (jus synthétique ou jus de raisins sulfité-désulfité) accomplir une fermentation totale du sucre présent ; elle synthétise la faible quantité qui lui est nécessaire.

On peut dire, *en conclusion générale*, qu'une trop grande concentration en thiamine, soit dans la levure, soit dans le milieu fermentaire, ralentit la fermentation.

Reçu pour publication en juillet 1969.

SUMMARY

EFFECT OF THE ORIGIN OF THIAMINE (YEAST OR ENVIRONMENT) ON THE SPEED OF ALCOHOLIC FERMENTATION

In determining the effect of thiamine on the speed of alcoholic fermentation two factors are involved :

— The thiamine content of the fermenting agents.
— The thiamine content of the fermentation environment.

1. *Yeast thiamine :* According to the level of thiamine in the yeast, the thiamine present in the fermentation environment will either increase, have no effect on, or reduce the speed of fermentation.

2. *Environmental thiamine :* The accelerating action of this thiamine, where it shows itself at all, occurs only at relatively low proportions : 50 to 100 µg/litre.

RESUMEN

INFLUENCIA DEL ORIGEN DE LA TIAMINA (LEVADURA O MEDIO) SOBRE LA VELOCIDAD DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

En la determinación de la influencia de la tiamina sobre la velocidad de la fermentación alcohólica intervienen dos factores, a saber :

— El contenido en tiamina de los agentes de fermentación,
— El contenido en tiamina del medio fermentante.

1. *Tiamina de la levadura :* Según la riqueza tiaminica de la levadura, la tiamina presente en el medio fermentante aumenta, no modifica o disminuye la velocidad de fermentación.

2. *Tiamina del medio :* La acción aceleradora de la tiamina, en caso de que la misma se manifieste, únicamente se manifiesta para dosis relativamente reducidas : 50 a 100 µg/litro.

RIASSUNTO

INFLUENZA DELL'ORIGINE DELLA TIAMINA (LIEVITO O MEZZO) SULLA VELOCITÀ DELLA FERMENTAZIONE ALCOOLICA

Due fattori intervengono nella determinazione dell'influenza della tiamina sulla velocità della fermentazione alcoolica :

— Il tenore in tiamina degli agenti della fermentazione,
— Il tenore in tiamina del mezzo fermentario.

1. Tiamina del lievito : Secondo la ricchezza tiaminica del lievito, la tiamina presente nel mezzo fermentario aumenta, non modifica o diminuisce la velocità della fermentazione.

2. Tiamina del mezzo : L'azione acceleratrice della tiamina, nel caso in cui essa si manifesta, non si manifesta che per dosi relativamente deboli : 50 a 100 µg/litro.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ARMAND Y. 1942. Application de la micromanométrie au dosage de l'aneurine. *Ann. Ferment.*, 7, 40-49.

ATKIN L., SCHULTZ A. S., FREY C. N. 1939 Ultramicrodetermination of thiamine by the fermentation method. *J. biol. Chem*, **129**, 471-476.

CASAS-LUCAS J. F. 1954. Vitamina B_1 como activador de la fermentacion vinica. *Consejo superior de Investigaciones cientificas*, Cuaderno nº 7.

DUPUY P., FLANZY M., 1954. Influence de la thiamine sur la fermentation du jus de raisin *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **40**, 273-277.

DUPUY P., NORTZ M., PUISAIS J. 1955. Les moûts de la Vienne et la vitamine B_1 en 1953. *C R. Acad. Agric. Fr.*, **41**, 56-58.

FLANZY M., OURNAC A. 1963. Fermentation des jus de raisin frais et désulfités. Influence d'additions de levures et de thiamine. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 65-84.

JACKSON S., KILKENNY B. C. 1951, *J. Chem. Soc.*, **2**, 1951 ; d'après MIRROS E. 1958, Yeast growth.

KIRSOP B. H. 1955. *J. Inst. Brewing*, **61**, 466 ; d'après MORRIS E. O. : Yeast growth, dans *The Chemisty and biology of yeasts* ; Academic Press, 1958.

LAFOURCADE S. 1954. Contribution à l'étude des activateurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisins. *Ann. Technol. agric.* **3**, 283-333.

LOCHHEAD A. G., LANDERKIN G. B. 1941. *J. Bacteriol.*, **42**, 18 ; d'après MORRIS E. O., 1948, Yeast growth.

MORRIS E. O. 1958. Yeast growth ; dans *The chemistry and biology of yeasts*. Academic Press Inc. Publishers, 195.

OURNAC A., FLANZY M. 1957. Localisation et évolution de la vitamine B_1 dans le raisin au cours de la maturation. *Ann. Technol. agric.*, **6**, 257-292.

PETERS R. A., LANCET 1936, **230**, 1161 ; d'après JACQUOT R., ARMAND Y., REY P., 1941. Méthodes de dosage de la vitamine B_1. *Bull. Soc. sci. Hyg. aliment.* **29**, 1-71.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E. Sur l'emploi en vinification de quelques activateurs vitaminiques de la fermentation. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **38**, 444-448.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E. 1953. Étude expérimentale de la vinification en rouge. *Chim. et Industr.*, **70**, 416-419 ; 694-700.

SHERMAN W. C., ELVEHJEM C. A. *Biochem. J.*, 1936, **30**, 785 ; d'après JACQUOT R., ARMAND Y., REY P., 1941 : Méthodes de dosage de la vitamine B_1 *Bull. Soc. sci. Hyg. aliment.*, **29**, 1-71.

SCHULTZ A. S., ATKIN L., FREY C. N. 1937. A fermentation test for vitamin B_1. *J. amer. chem. soc.*, **59**, 948-949 ; 2457-2460.

WILDIERS E. 1901. Nouvelle substance indispensable au développement de la levure. *La Cellule*, 18, 313-331.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (3), 199-206.

INFLUENCE DES CONSTITUANTS DE LA THIAMINE, AVANT ET APRÈS SULFITATION, SUR LA VITESSE DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

Andrée OURNAC

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Étant donné que l'anhydride sulfureux employé fréquemment en vinification peut scinder la molécule de thiamine en ses deux constituants, on a voulu comparer l'influence sur la vitesse de la fermentation alcoolique, d'une part de chacun des 2 constituants naturels de la thiamine, d'autre part de ceux obtenus après traitement par l'anhydride sulfureux.

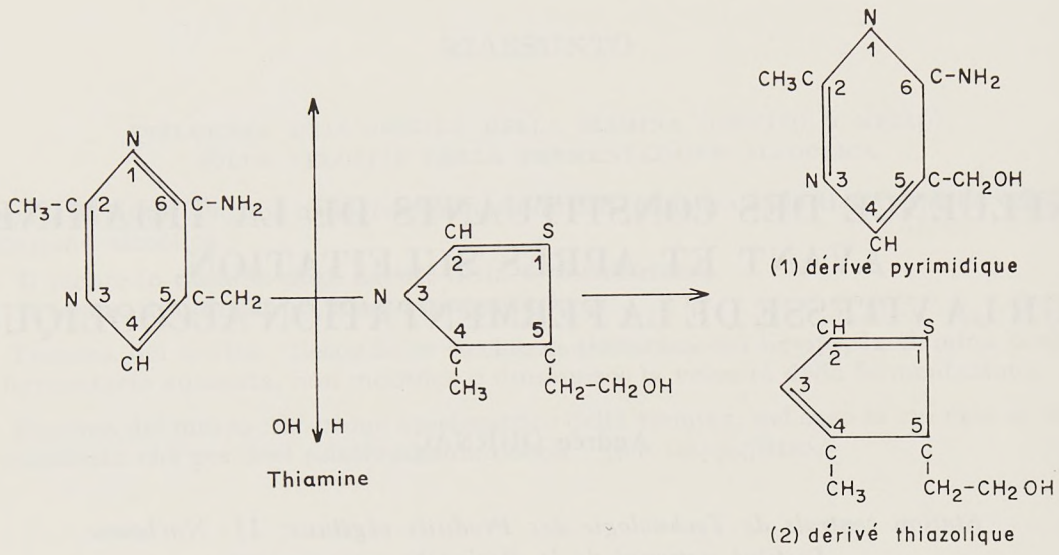
I. — INFLUENCE DES CONSTITUANTS DE LA THIAMINE

Introduction

En 1937, Schultz, Atkin et Frey, en étudiant le dosage de la vitamine B_1 par le test de fermentation, se sont aperçus que la levure autoclavée n'a plus de valeur vitaminique si on considère le test de croissance du Rat, mais possède toujours son pouvoir de stimulation sur la fermentation ; il en est de même pour des solutions de thiamine chauffées à l'ébullition en milieu alcalin. Étant donné que dans ces condi-

tions la thiamine est scindée en ses deux constituants, ils ont examiné l'influence sur la fermentation des deux corps constitutifs de la thiamine, c'est-à-dire :

(1) 2–méthyl 5–hydroxyméthyl 6–aminopyrimidine.
(2) 4–méthyl 5–(β–hydroxyéthyl) thiazole.



Ils ont établi que seul le dérivé pyrimidique a une action sur la fermentation, le dérivé thiazolique est totalement inactif.

En dehors de la levure autoclavée ils n'ont pas trouvé de sources naturelles du dérivé pyrimidique interférant ou de ses équivalents.

On a alors essayé d'appliquer les résultats de ces auteurs aux fermentations de jus synthétiques et frais, réalisées dans les conditions d'élaboration des vins.

Protocole des essais

Des jus synthétiques et des jus de raisins frais ont été additionnés des dérivés pyrimidique et thiazolique, séparément et simultanément, ainsi que de thiamine, à des doses correspondantes, comprises entre 100 et 600 μg par litre. Les milieux synthétiques ont tous été ensemencés à raison de $2 \cdot 10^6$ germes/ml avec *Saccharomyces ellipsoideus*.

Les modalités d'élaboration des jus synthétiques et naturels, de l'ensemencement, ainsi que de l'établissement des courbes de fermentation étaient identiques à celles utilisées au cours d'une étude précédente. (OURNAC, 1969).

Résultats

Comme il a été établi par les auteurs précités, on a constaté, tant pour les jus synthétiques que pour les jus frais, avec *Saccharomyces ellipsoideus* comme agent de la fermentation, que :

— le dérivé pyrimidique, ou l'association dérivé pyrimidique + dérivé thiazolique, exercent la même influence accélératrice sur la vitesse de fermentation que la dose correspondante de thiamine ;

— le dérivé thiazolique seul n'a aucune influence sur la vitesse de la fermentation.

Mais pendant la fermentation, au cours de l'action de la pyruvodécarboxylase, l'acide α–cétonique se fixe par sa fonction cétone sur le CH en position 2 du noyau

thiazole (Breslow, 1957) ; donc la décarboxylation ne peut avoir lieu sans la présence du dérivé thiazolique et la thiamine entière doit figurer dans la carboxylase.

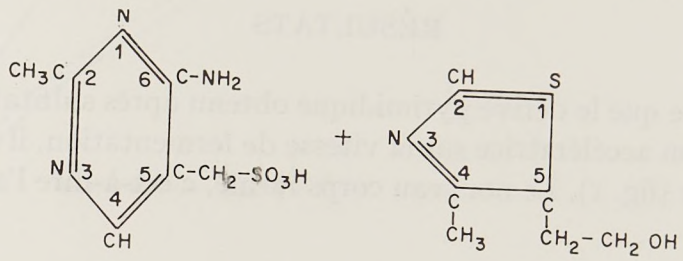
Il faut donc admettre que lorsque l'on ajoute le dérivé pyrimidique seul, il y a immédiatement synthèse du dérivé thiazolique, élaboration de thiamine, puis formation de carboxylase ; la levure serait donc capable de fabriquer le dérivé thiazolique et non le dérivé pyrimidique.

II. — ACTION DES SULFITES

Introduction

C'est en 1935 que Williams *et al.* découvrent l'action des sulfites sur la thiamine. Ils avaient remarqué quelques années plus tôt que le riz poli que l'on préservait contre les bactéries par l'emploi d'acide sulfureux perdait rapidement et complètement son activité antinévrétique.

Ils établissent que les sulfites scindent la molécule de thiamine en deux corps :



(1) (2)

(1) 2-méthyl-6-aminopyrimidine-5-méthyl acide sulfonique, substance acide, faiblement soluble dans l'eau, insoluble dans les autres solvants.

(2) 4-méthyl-5β-hydroxyéthyl thiazole, substance basique, soluble dans l'eau mais extractible par le chloroforme à partir d'une solution alcaline.

Selon ces auteurs, les conditions d'action des sulfites sont les suivantes :

1° à pH = 1, température du laboratoire, en présence de sulfite de Na 2,6 N, la thiamine perd la moitié de son activité évaluée par injection à des rats, en 36 heures.

2° à pH = 5, les autres conditions expérimentales étant identiques aux précédentes, la destruction de la thiamine est totale en 24 à 48 heures.

3° à pH = 5, la destruction de la thiamine est totale en 30 minutes au bain de vapeur. La dose de sulfite employée est d'environ 15 g pour 500 μg de thiamine.

Schultz et *al.* (1941) ont démontré que les deux produits de clivage de la thiamine par les sulfites sont sans effet sur la vitesse de fermentation.

L'emploi d'une solution aqueuse saturée d'anhydride sulfureux provoque une destruction très lente de l'activité ; après 3 mois à la température du laboratoire, 50 p. 100 de clivage sont obtenus.

Nous avons alors cherché à déterminer l'influence, sur la vitesse de la fermentation alcoolique, des constituants de la thiamine obtenus par clivage sulfitique, avant et après leur désulfitation.

Nous avons ensuite examiné la fermentation de jus de raisins élaborés par la technique *sulfitation-désulfitation*, de Flanzy et André (1959), jus qui ne renferment plus de thiamine entière dosable par la méthode au thiochrome (Ournac, Flanzy, 1957).

Protocole des essais

1° Nous avons élaboré les deux composés de scission de la thiamine par le sulfite de Na, selon la technique exposée par Williams et *al.* (1935). Plusieurs doses de ces deux composés ont été ajoutées séparément et simultanément, ainsi que les doses correspondantes de thiamine entière (soit 50 et 100 µg/l), à des jus synthétiques ensemencés à $2 \cdot 10^6$ levures/ml avec *S. ellipsoideus*.

2° Nous avons voulu voir si le dérivé pyrimidique sulfité pouvait être désulfité par la même technique qui permet la désulfitation des jus de raisins et retrouver par là son action sur la fermentation. Le composé pyrimidique sulfité obtenu précédemment a été solubilisé dans une solution tampon de bitartrate de K, pH = 3, puis après passage au désulfiteur selon Flanzy-André (1959), il a été ajouté à des jus synthétiques ensemencés.

3° Nous avons aussi mis en fermentation divers lots de jus de raisins, de goutte et de macération, « sulfités-désulfités », élaborés selon la technique Flanzy-André (1959), et ensemencés à $2 \cdot 10^6$ et $15 \cdot 10^6$ levures/ml. Ces jus sont totalement dépourvus de thiamine entière.

RÉSULTATS

1° On constate que le dérivé pyrimidique obtenu après sulfitation de la thiamine a perdu toute action accélératrice sur la vitesse de fermentation, il a même acquis une action retardatrice (fig. 1). Le nouveau corps formé, c'est-à-dire l'acide sulfonique du

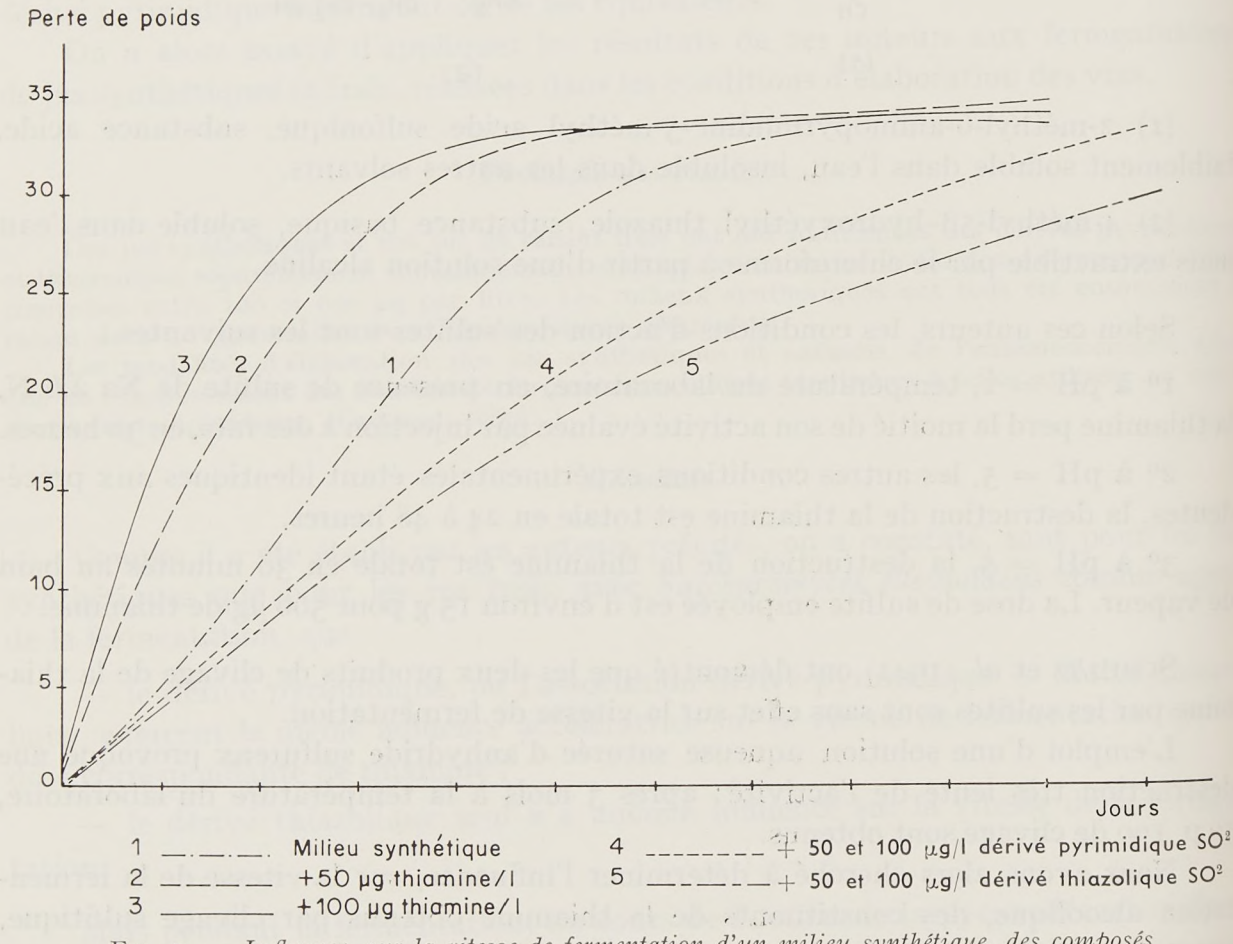


Fig. 1. — *Influence, sur la vitesse de fermentation d'un milieu synthétique, des composés de scission de la thiamine par les sulfites.*

dérivé pyrimidique, pourrait avoir la même action qu'un homologue compétitif, de toute façon il est inutilisable par la levure pour élaborer la thiamine.

2° Par passage au désulfiteur, le dérivé pyrimidique précédent ne retrouve pas son action accélératrice sur la fermentation et conserve son action retardatrice (fig. 2). On sait que la fonction $-SO_3H$ est difficile à décrocher, son élimination est favorisée par la présence du groupe $-CO_2H$, dans la molécule et empêchée par celle du groupe $-NH_2$ (Matsui et Sakurada, 1932).

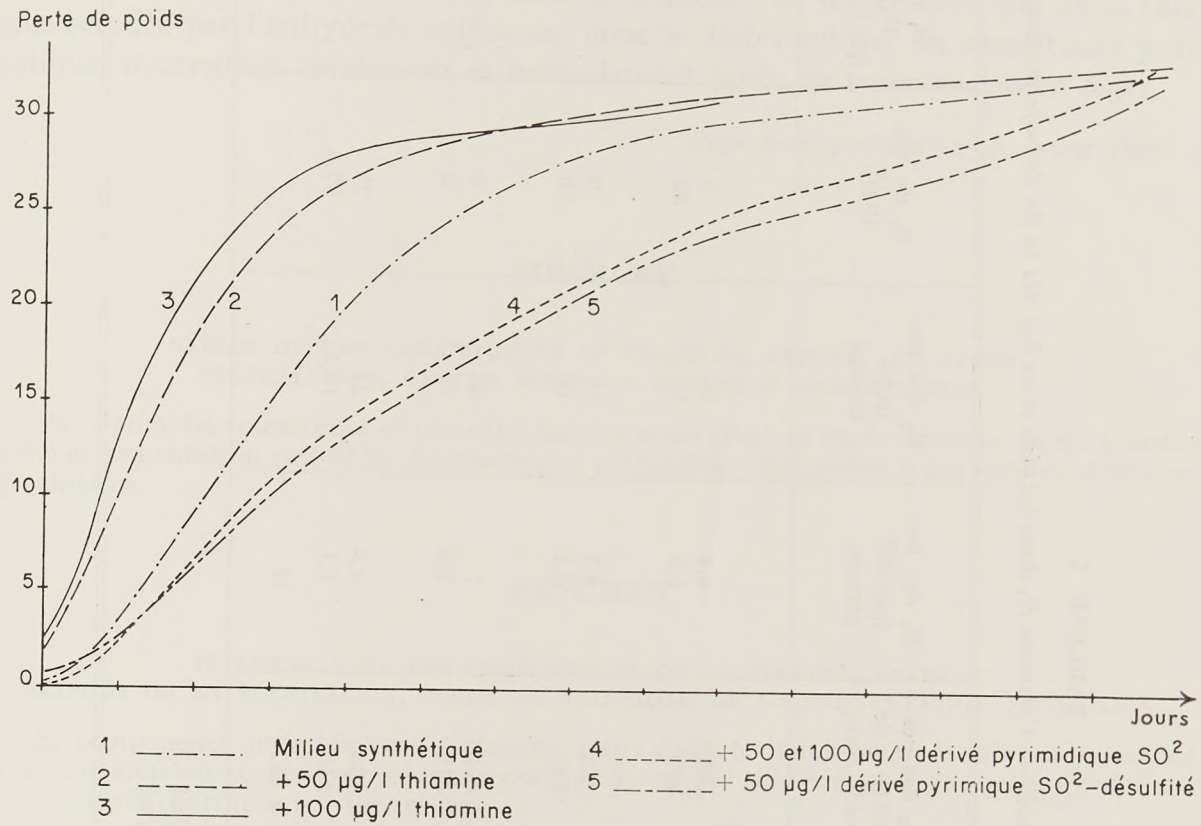


Fig. 2. — *Influence, sur la vitesse de fermentation d'un milieu synthétique, des composés de scission de la thiamine par les sulfites après passage au désulfiteur.*

3° *Dans tous les jus « sulfités-désulfités »* la fermentation s'est effectuée normalement, les essais ensemencés à $15 \cdot 10^6$ germes/ml, fermentant plus rapidement que ceux ensemencés à $2 \cdot 10^6$. Dès la fermentation terminée, la thiamine a été dosée dans les vins et dans les lies, selon Ournac et Flanzy (1957) (tabl. 1). Le vin renferme alors 5 à 56 µg de thiamine/l pendant que la somme thiamine du vin + thiamine des lies est comprise entre 10 et 60 µg/l., déduction faite de l'apport dû à l'ensemencement. Cette quantité de thiamine a été élaborée par la levure, elle correspond à ses besoins que nous avons fixés précédemment entre 50 et 100 µg par litre. On remarque que la quantité de thiamine synthétisée est plus faible quand l'ensemencement est plus important. Ces résultats sont identiques à ceux observés précédemment avec les jus synthétiques dépourvus de thiamine.

TABLEAU I

Fermentation de jus désulfités et ensemencés — Vitamine B_1 dans les vins et les lies dès la fin de la fermentation

	Levures (10^6/ml)	Poids des lies (g/l de vin)	B_1 des lies (μg/100 g de poids frais)	B_1 des lies (μg/10^{10} germes)	B_1 des lies (μg/l de vin)	B_1 du vin (μg/l)	B_1 du vin + B_1 des lies (μg/l de vin)	B_1 élaborée (B_1 totale — B_1 du levain) (1)
Aramon goutte								
$2 \cdot 10^6$/ml	73	9,030	509,4	6,3	46	5	51	45
$15 \cdot 10^6$/ml	101	9,255	497	4,5	46	38	84	39
Aramon macéré								
$2 \cdot 10^6$/ml	68	7,755	763	8,7	59	9	68	62
$15 \cdot 10^6$/ml	83	7,745	141	3,2	11	10	21	0
Carignan goutte								
$2 \cdot 10^6$/ml	78	8,505	644	7	55	5	60	54
$15 \cdot 10^6$/ml	95	10,360	675	7,3	70	5	75	30
Morastel goutte								
$2 \cdot 10^6$/ml	90	6,890	363	2,8	25	24	49	43
$15 \cdot 10^6$/ml	136	9,970	153	1,1	15,5	57,5	73	28
Levain	90	11,815	2 352	31				

(1) B_1 ajoutée avec le levain : 6μg/l pour $2 \cdot 10^6$ germes/ml
46μg/l pour $15 \cdot 10^6$ germes/ml.

CONCLUSION

C'est le constituant pyrimidique de la thiamine qui agit sur la vitesse de la fermentation alcoolique provoquée par *Saccharomyces ellipsoideus* ; cette action est détruite irréversiblement par les sulfites.

Cependant, des jus de raisins, sulfités-désulfités, ne renfermant que de la thiamine scindée par l'anhydride sulfureux, donc le dérivé sulfoné du constituant pyrimidique, fermentent totalement et normalement après un ensemencement léger.

Reçu pour publication en juillet 1969.

SUMMARY

EFFECT OF THE CONSTITUENTS OF THIAMINE, BEFORE AND AFTER SULPHITATION, ON THE SPEED OF ALCOHOLIC FERMENTATION

The pyrimidic constituent of thiamine has the same effect as whole thiamine on the speed of alcoholic fermentation caused by *Saccharomyces ellipsoideus;* this action is irreversibly destroyed by sulphites.

RESUMEN

INFLUENCIA DE LOS COMPONENTES DE LA TIAMINA, ANTES Y DESPUÉS DE LA SULFITACION, SOBRE LA VELOCIDAD DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

El componente pirimídico de la tiamina actúa como la tiamina entera sobre la velocidad de la fermentación alcohólica provocada por *Saccharomyces ellipsoïdeus*. Esta acción queda irreversiblemente destruida por los sulfitos.

RIASSUNTO

INFLUENZA DEI COSTITUENTI DELLA TIAMINA, PRIMA E DOPO SULFITAZIONE, SULLA VELOCITA DELLA FERMENTAZIONE ALCOOLICA

Il costituente pirimidico della tiamina agisce come la tiamina intera sulla velocità della fermentazione alcoolica provocata da *Saccharomyces ellipsoïdeus;* questa azione è distrutta irreversibilmente dai sulfiti.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Breslow R., 1957. *J. amer. chem. Soc.*, **79**, 1762

Breslow R., 1957, *Chem. and Industry*, 893.

Breslow R., 1958. *J. amer. chem. Soc.*, **80**, 3719 d'après : Metzler D.E. 1960 : « Thiamine coenzymes » dans *The enzymes*, Academic Press, **2**, 295-337.

Flanzy M., André P., 1959. Désulfitation des jus de raisin. *Ann. Technol. agric.*, **8**, 171-192.

Matsui, Sakurada. *Mem. Coll. Sci.* Kyoto, 1932, **15**, 181 d'après Grignard V., 1936 : *Traité de Chimie organique*, IV Masson et C^ie^, éditeurs.

Ournac A., Flanzy M. 1957. Localisation et évolution de la vitamine B_1 dans le raisin au cours de la maturation. *Ann. Technol. agric.*, **6**, 257-292.

Ournac A. 1969. Influence de l'origine de la thiamine (levure ou milieu) sur la vitesse de la fermentation alcoolique. *Ann. Technol. agric.* **18**(3), 187-198.

Schultz A. S., Atkin L., Frey C. N., 1937. A fermentation test for vitamine B_1. *J. amer. chem. Soc.*, **59**, 948-949 et 2457-2460.

Schultz A. S., Atkin L., Frey C. N., Williams R. R., 1941. Application of the sulfite cleavage of thiamine to the yeast fermentation method. *J. amer. chem. Soc.*, **63**, 632-633.

Williams R. R., Waterman R. F., Keresztesy J. C., Buchman E. R. 1935. Studies of crystalline vitamine B_1. III. Cleavage of vitamine with sulfite. *J. amer. chem. Soc.*, **57**, 536-537

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (3), 207-219.

ÉTUDE DANS LES VINS DU TYROSOL, DU TRYPTOPHOL, DE L'ALCOOL PHÉNYLÉTHYLIQUE ET DE LA γ-BUTYROLACTONE, PRODUITS SECONDAIRES DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

I. — Identifications et méthodes de dosage

J.-C. SAPIS et P. RIBÉREAU-GAYON

Institut d'Œnologie
351, Cours de la Libération, 33 - Talence
Université de Bordeaux et Institut national de la Recherche agronomique

---

SOMMAIRE

Les auteurs décrivent les expériences qui leur ont permis de démontrer définitivement la présence du tyrosol et du tryptophol dans le vin, qui contient en outre d'autres constituants de nature indolique, actuellement non identifiés.

Des méthodes de dosage de ces deux corps, également de l'alcool phényléthylique et de la γ-butyrolactone, sont décrites ; elles utilisent différentes techniques de chromatographie sur papier et en phase gazeuse.

INTRODUCTION

Au cours de la fermentation alcoolique la levure forme, en dehors de l'éthanol et du glycérol, différents alcools supérieurs, dont les principaux sont l'alcool isoamylique et l'alcool isobutylique. Par leurs propriétés organoleptiques, et celles de leurs esters, ces substances jouent un rôle dans la constitution de l'arôme des vins.

Dès 1906, Ehrlich a décrit le mode de formation de ces alcools supérieurs à partir des aminoacides correspondants à $n + 1$ atomes de carbone (fig. 1). Genevois (1952) a discuté les différentes étapes de ces mécanismes qui laissent, dans le milieu de fermentation, un certain nombre de témoins des réactions intermédiaires.

Nous nous sommes attachés à l'étude, dans le vin, de quatre parmi ces produits secondaires de la fermentation qui étaient peu connus : le tyrosol ou alcool *p*-hydroxy-

phényléthylique, le tryptophol ou alcool indoléthylique, l'alcool phényléthylique et la γ-butyrolactone.

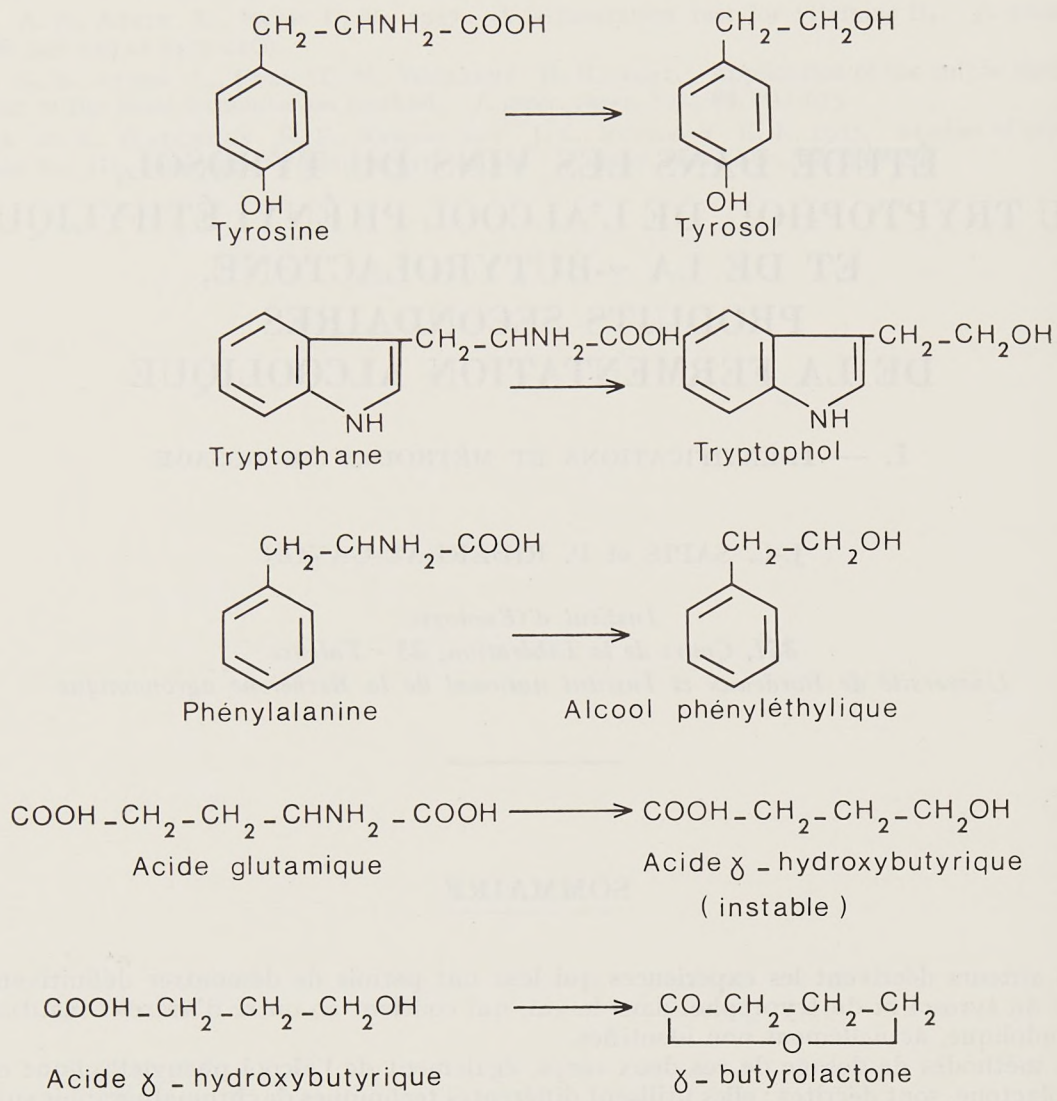


FIG. 1. — *Formation de tyrosol, de tryptophol, d'alcool phényléthylique et de γ-butyrolactone à partir des aminoacides correspondants*

La présence de tyrosol dans les milieux de fermentation a été signalée pour la première fois par EHRLICH (1911). Cet alcool se trouve à l'état solide à la température ordinaire et possède une agréable odeur de cire ou de miel ; sa saveur est amère et certains auteurs en font un constituant de l'amertume de la bière et du saké. Discutant les travaux d'EHRLICH, GENEVOIS (1951) suppose que le tyrosol est présent dans le vin et que sa concentration doit être suffisante pour intervenir par son odeur.

Comme le tyrosol, le tryptophol a été signalé par EHRLICH (1912). Cet alcool ne possède pas d'odeur caractéristique et a une saveur faiblement amère.

EHRLICH (1908) a également montré que la levure forme de l'alcool phényléthylique, « principe odorant de la rose », à partir de la phénylalanine ; cet alcool possède une agréable odeur de fleur qui joue certainement un rôle dans l'arôme des vins, dont il est un constituant normal (BOIDRON, 1966).

La γ-butyrolactone, qui proviendrait de la fermentation de l'acide glutamique par l'intermédiaire de l'acide γ-hydroxybutyrique instable, et dont la formation est

en relation avec l'acide α-cétoglutarique (Blouin, 1966), a été identifiée dans les vins américains par Webb et Kepner (1962) ; elle a été retrouvée de façon systématique dans les vins de Bordeaux (Boidron, 1966).

Nous décrivons dans ce travail les résultats des recherches qui nous ont conduits à montrer définitivement la présence de tyrosol et de tryptophol dans le vin. Ces travaux nous ont montré que le vin contient d'autres substances, probablement de nature indolique, actuellement non identifiées.

Également, nous exposons les méthodes de dosage que nous avons mises au point afin de pouvoir réaliser une étude systématique de ces corps dans le vin. Il nous a paru utile de doser simultanément l'alcool phényléthylique et la γ-butyrolactone, pour lesquels nous avons dû aussi mettre au point des méthodes appropriées.

Les résultats de ces dosages et leur interprétation seront exposés dans une autre publication.

RECHERCHE ET IDENTIFICATION DU TYROSOL

Expériences préliminaires

Au cours de ses recherches sur les composés phénoliques du raisin et du vin, en particulier lors de la séparation et de l'identification des acides phénols, l'un de nous (Ribéreau-Gayon, 1963) a constaté la présence sur les chromatogrammes d'un spot non identifié, présent en quantité appréciable ; la substance correspondant à ce spot n'est pas fluorescente en lumière ultraviolette et donne une coloration bleu-violet caractéristique sous l'action de la *p*-nitraniline diazotée en milieu alcalin.

Dans le cadre d'une étude systématique des composés phénoliques des vins blancs, nous avons été amenés à reprendre ces travaux (Sapis, 1967) et plus particulièrement l'identification de cette substance.

Pour cela, nous avons d'abord analysé le même moût de raisin, avant et après fermentation. L'extraction de la substance inconnue par l'éther éthylique et sa mise en évidence par chromatographie ont été effectuées à l'aide des méthodes précédemment décrites (Ribéreau-Gayon, 1963). La comparaison des chromatogrammes des extraits, obtenus avant et après fermentation, montre sans ambiguïté que la substance étudiée est un produit secondaire de la fermentation alcoolique.

Nous avons ensuite cherché à déterminer si cette substance a les propriétés d'un acide. Pour cela, nous avons effectué le fractionnement d'un extrait de vin par l'éther, à l'aide d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium dans laquelle les sels des corps à fonction acide sont solubles. Le principe du fractionnement est décrit par la figure 2. La substance étudiée se retrouve avec les substances non acides ; ce n'est donc pas un acide phénol.

Ces essais préliminaires montraient donc que nous étions en présence d'une substance ayant les caractéristiques suivantes :

1° présence d'une fonction phénol par suite de la réaction avec la *p*-nitraniline diazotée (Ribéreau-Gayon, 1963) ;

2° formation au cours de la fermentation alcoolique ;

3° absence de fonction acide.

En présence de ces résultats, E. Peynaud (communication personnelle) a pu émettre l'hypothèse qu'il pourrait s'agir du tyrosol ou alcool *p*-hydroxyphényléthylique, formé au cours de la fermentation à partir de la tyrosine.

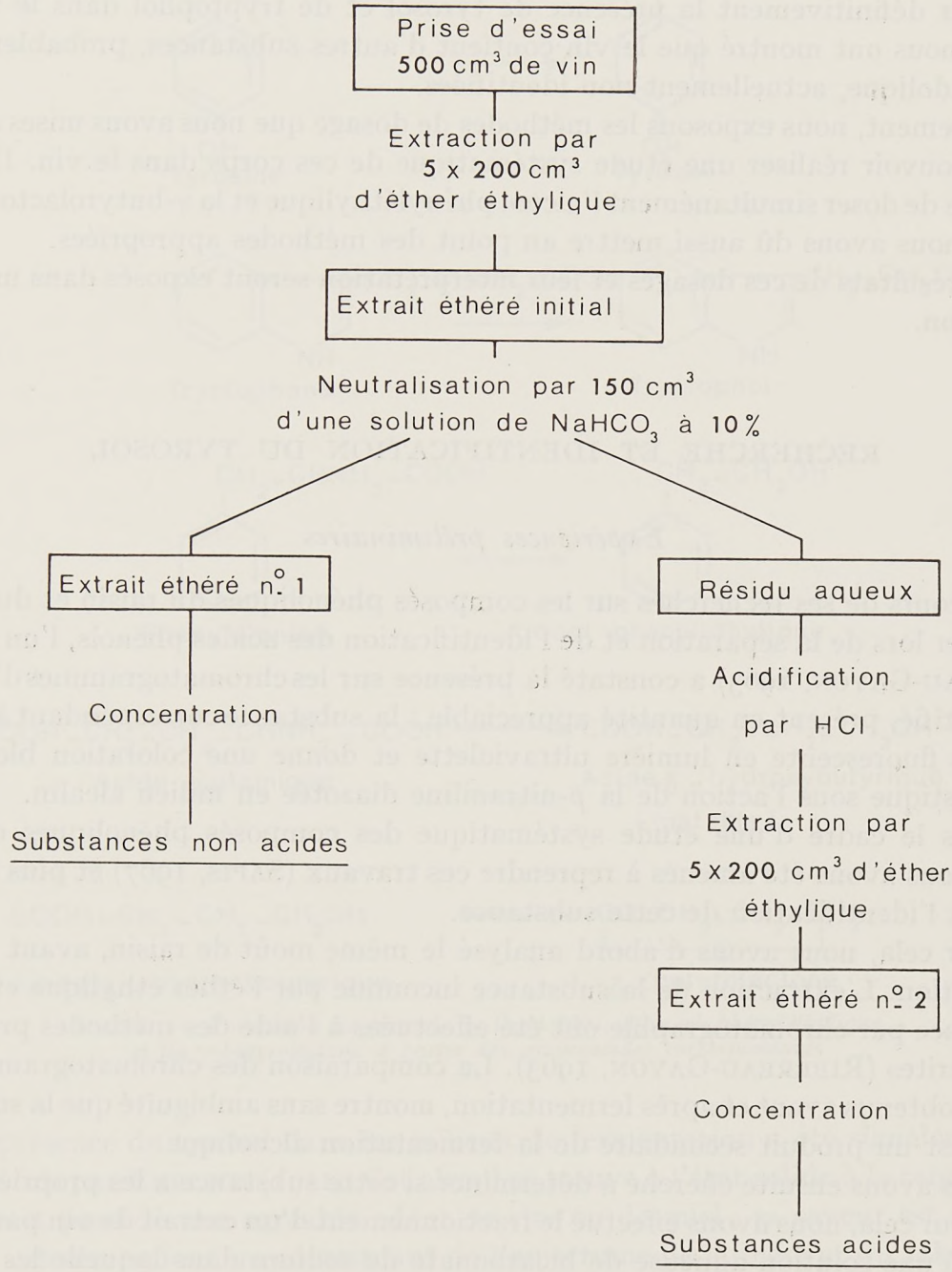


Fig. 2. — *Schéma du fractionnement des substances acides et non acides extraites du vin par l'éther éthylique*

Préparation d'un échantillon de référence

Une identification rigoureuse, par voie chromatographique, supposait la comparaison avec un produit de référence ; celui-ci n'étant pas disponible commercialement, nous avons dû le préparer au laboratoire.

Nous avons obtenu un échantillon de tyrosol par voie biologique, selon le procédé décrit par Ehrlich (1910), en faisant fermenter, par une souche de *Saccharomyces*

ellipsoideus, quatre litres d'une solution synthétique à base de L-tyrosine, dont la composition est la suivante :

Glucose	200 g par litre
L-tyrosine	10 g par litre
(dissous dans HCl dilué, amenés à pH 3,5)	
Acide citrique	6 g par litre
Phosphate acide de potassium	5 g par litre
Cendres de levures	5 g par litre
Solution de facteurs de croissance (LAFOURCADE, 1955)	5 cm³ par litre

Après fermentation, l'extraction a été effectuée par l'éther éthylique (5 fois 1,5 litre) ; le tyrosol cristallise après évaporation du solvant ; on obtient 2,5 g de tyrosol sous forme de cristaux étoilés, semblables à des cristaux de glace. Le produit n'est certainement pas rigoureusement pur, mais il est suffisant pour effectuer des identifications par chromatographie ; il ne donne qu'un seul spot sur les chromatogrammes.

L'identification de ce produit a été contrôlée par la comparaison des spectres d'absorption dans l'ultraviolet et dans l'infrarouge avec ceux donnés par la littérature (NYKANEN *et al.*, 1966).

Identification du tyrosol dans le vin

A l'aide de ce produit de référence, nous avons pu démontrer de façon rigoureuse que la substance inconnue, mise en évidence dans le vin, est du tyrosol.

Nous avons comparé les Rf dans les deux solvants suivants :

a) *Toluène-acétique :* couche supérieure du mélange toluène 4, acide acétique 1, eau 5. Ce solvant est très volatil, il est indispensable d'équilibrer le papier pendant douze heures avec la phase aqueuse, avant le développement du chromatogramme proprement dit.

b) *Butanol-acétique :* couche supérieure du mélange butanol 4, acide acétique 1, eau 5.

Dans le toluène-acétique le tyrosol a un Rf de 0,02 et dans le butanol-acétique il est de 0,80.

Également nous avons utilisé la comparaison des réactions colorées données par ce corps avec différents révélateurs.

a) p-*Nitraniline diazotée.*

Le réactif est préparé au moment de l'emploi de la façon suivante :

p-nitraniline à 0,5 p. 100 dans HCl 2 N.	2 cm³
nitrite de sodium à 5 p. 100	3 à 5 gouttes
acétate de sodium à 20 p. 100	8 cm³

On pulvérise légèrement ce mélange sur le chromatogramme et, tout de suite après, une solution de carbonate de sodium à 15 p. 100. Le tyrosol apparaît sous forme d'un spot violet.

b) *Acide sulfanilique diazoté.*

La méthode de préparation de ce réactif est la même que celle de la *p*-nitraniline diazotée, en remplaçant ce corps par l'acide sulfanilique. Le tyrosol, dans ce cas, donne un spot rouge orangé.

c) *Réactif de Millon.*

On pulvérise sur le chromatogramme un mélange contenant 15 g de sulfate de mercure dans 100 ml d'acide sulfurique 5 N. On sèche à 80°C et on pulvérise une solution de nitrite de sodium à 0,2 p. 100. Comme précédemment, le tyrosol donne un spot rouge vif.

d) *Nitrosonaphtol.*

C'est un réactif spécifique de la tyrosine et de certains de ses dérivés (LEDERER, 1960). On pulvérise une solution à 0,1 p. 100 de α-nitroso β-naphtol dans l'alcool éthylique. On sèche et on pulvérise le chromatogramme avec une solution d'acide nitrique à 10 p. 100. Le tyrosol apparaît sous forme d'un spot rouge carmin.

A titre d'exemple, la figure 3 donne le schéma d'un chromatogramme ayant permis l'identification du tyrosol.

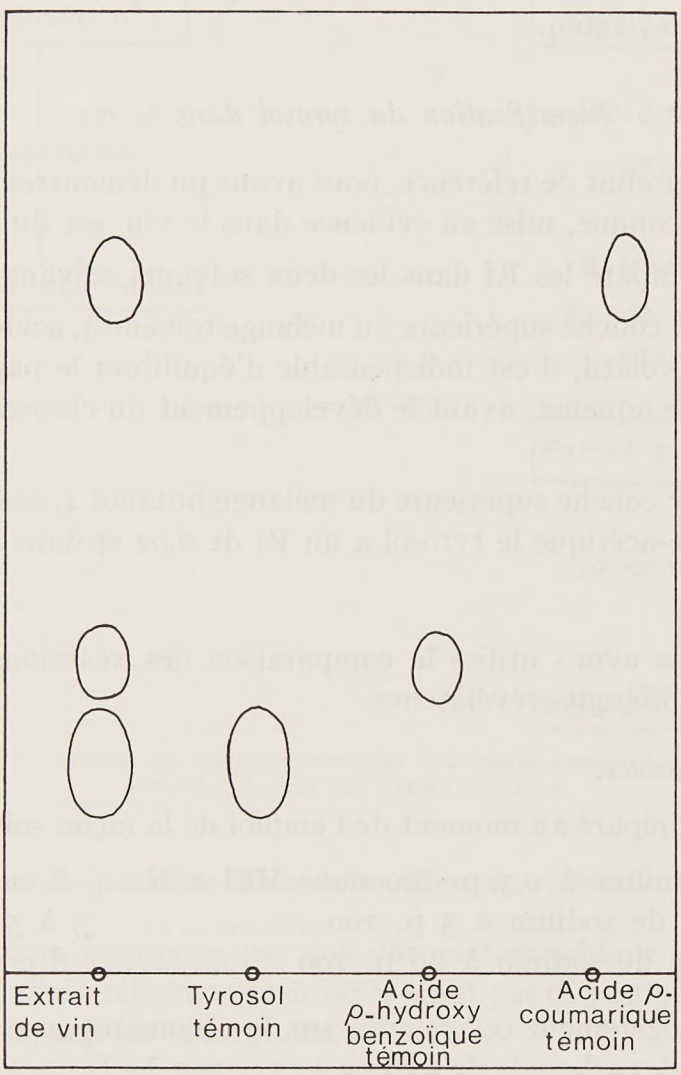


FIG. 3. — *Séparation du tyrosol du vin par chromatographie sur papier* (conditions opératoires cf. texte)

On sépare successivement :

— le spot violet du tyrosol (Rf = 0,02),

— un spot rouge vif de Rf légèrement supérieur à celui du tyrosol (0,06) ; il correspond à l'acide *p*-hydroxybenzoïque,

— un spot bleu marine de Rf plus élevé (0,10) qui correspond à l'acide *p*-coumarique.

Sur le chromatogramme de la figure 3, une durée de développement importante permet d'avoir des déplacements suffisants malgré les faibles valeurs de Rf.

RECHERCHE ET IDENTIFICATION DU TRYPTOPHOL ET DES SUBSTANCES INDOLIQUES

Isolement des substances indoliques du vin

Au cours de leurs recherches sur les tanins et la matière colorante des vins rouges, RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET (1966) ont remarqué la présence, sur les chromatogrammes dans le butanol-acétique d'extraits par l'éther de vin rouge, de deux corps A et B ayant comme Rf respectivement 0,86 et 0,76 et réagissant en violet sous l'action de la vanilline en milieu chlorhydrique.

Le noyau indol donnant une réaction identique, nous avons cherché à identifier A et B à des substances de cette famille.

Nous avons tout d'abord cherché à isoler A et B par chromatographie préparative. Le vin est extrait par l'éther dans les mêmes conditions que pour l'extraction

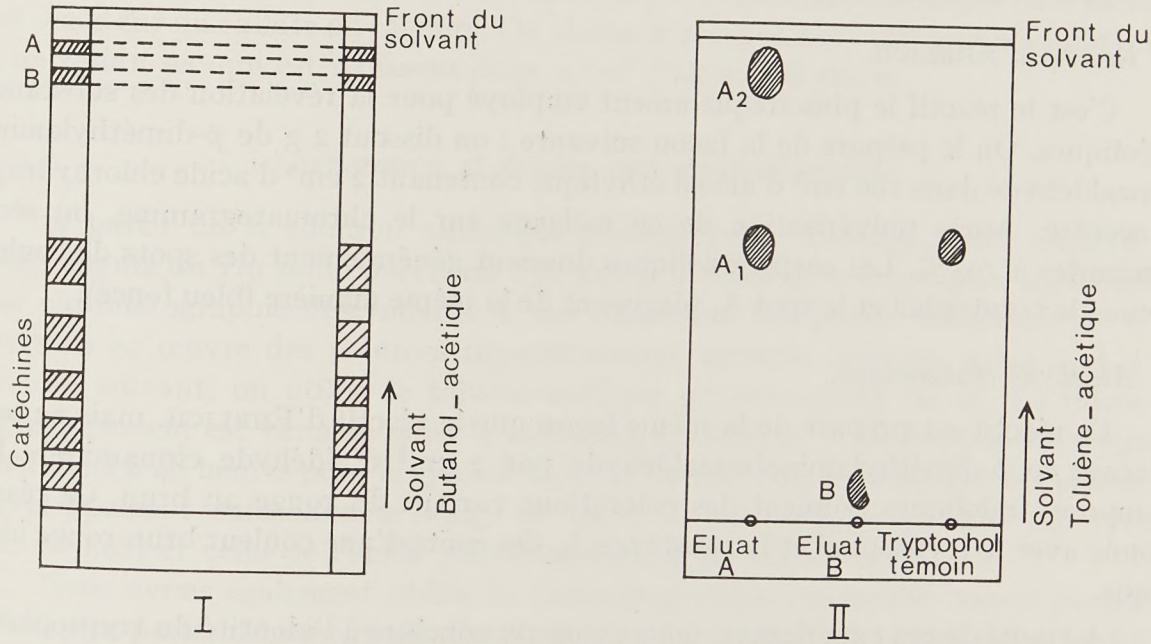


FIG. 4. — *Isolement et identification par chromatographie sur papier des substances inconnues A et B de nature indolique*

I : Isolement de A et de B par chromatographie préparative. Les bords latéraux du chromatogramme sont révélés avec la vanilline de façon à déterminer l'emplacement des bandes qui sont ensuite découpées et éluées.

II : Chromatographie analytique des éluats de A et de B.

du tyrosol ; l'extrait obtenu est concentré puis chromatographié sur plusieurs feuilles de papier, en utilisant le butanol-acétique comme solvant. On découpe les bords marginaux des chromatogrammes, qui sont révélés par pulvérisation de vanilline-chlorhydrique (voir ci-dessous) ; les différentes catéchines donnent des colorations roses et à la partie supérieure des chromatogrammes, les spots A et B réagissent en violet (fig. 4). On repère ainsi, sur la partie principale des chromatogrammes, la position des bandes A et B qui sont découpées et éluées avec de l'alcool éthylique contenant 30 p. 100 d'eau. Les éluats sont concentrés sous vide.

Identification des substances indoliques

Les deux éluats, correspondant aux spots A et B, ont été rechromatographiés par comparaison avec du tryptophol de référence.

On constate que A contient deux substances A_1 et A_2, alors que B correspond à une seule substance indolique. D'autre part A_1 est identique au tryptophol.

Nous avons utilisé les solvants précédemment décrits, toluène-acétique et butanol-acétique ; les Rf du tryptophol, et par conséquent de A_1, sont respectivement de 0,60 et 0,86.

A titre d'exemple, la figure 4 montre le schéma d'un chromatogramme obtenu dans le toluène-acétique ; les Rf de A_2 et de B sont respectivement 0,98 et 0,02.

L'identification de A_1 a été confirmée par la considération des réactions colorées avec différents révélateurs :

a) *Vanilline-chlorhydrique.*

On dissout 1 à 5 g de vanilline dans 5 à 10 cm^3 d'acide chlorhydrique concentré. Le tryptophol, comme A_1, donne immédiatement une même couleur rose-violet.

b) *Réactif d'*Ehrlich.

C'est le réactif le plus fréquemment employé pour la révélation des substances indoliques. On le prépare de la façon suivante : on dissout 2 g de *p*-diméthylaminobenzaldéhyde dans 100 cm^3 d'alcool éthylique contenant 2 cm^3 d'acide chlorhydrique concentré. Après pulvérisation de ce mélange sur le chromatogramme, on sèche 3 minutes à 105°C. Les corps indoliques donnent généralement des spots de couleur bleue ; le tryptophol et le spot A_1 réagissent de la même manière (bleu foncé).

c) *Aldéhyde cinnamique.*

Ce réactif est préparé de la même façon que le réactif d'Ehrlich, mais en remplaçant le *p*-diméthylaminobenzaldéhyde par 2 cm^3 d'aldéhyde cinnamique. Les composés indoliques donnent des colorations variant du rouge au brun. Ce réactif donne avec le tryptophol et la substance A_1 des spots d'une couleur brun-rouge identique.

A l'issue de ces expériences, nous avons pu conclure à l'identité du tryptophol et de la substance correspondant au spot A_1.

En ce qui concerne les substances A_2 et B, nous avons étudié leurs caractéristiques chromatographiques dans plusieurs solvants et étudié leurs réactions avec de nombreux indicateurs colorés. Les résultats ont été comparés avec ceux donnés par vingt-

huit substances indoliques ou phénoliques sans qu'il soit possible d'aboutir à leur identification. Ces essais ont été décrits par ailleurs (SAPIS, 1967).

Nous avons montré également (SAPIS, 1967) que les extraits par l'éther de certains vins de Bordeaux contiennent d'autres substances, non identifiées, probablement de la même famille ; elles sont mises en évidence sur les chromatogrammes dans le toluène-acétique, après révélation avec le réactif d'EHRLICH.

DOSAGE DU TYROSOL ET DU TRYPTOPHOL

Extraction

Le tyrosol et le tryptophol sont extraits dans une ampoule à décanter, par agitation pendant quelques minutes de 500 cm³ de vin, soit avec de l'éther éthylique, soit avec de l'acétate d'éthyle (200 cm³). On répète l'opération cinq fois successivement.

Afin de nous assurer que le tryptophol et le tyrosol sont extraits en totalité, nous avons recherché ces substances dans les différentes fractions successives d'éther éthylique. Nous avons ainsi constaté que la totalité de ces corps passe dans la phase éthérée à l'issue des cinq extractions de 200 cm³ chacune. Ils sont totalement absents dans un sixième extrait.

D'autre part, nous avons constaté qu'avec ce mode opératoire on retrouve quantitativement, dans l'extrait, le tyrosol d'une solution titrée du produit pur. Des fractions aliquotes de la solution initiale et de l'extrait ramené au volume initial donnent, par chromatographie, des spots de tyrosol de dimensions et d'intensités identiques.

En vue du dosage, les différents extraits par l'éther sont mélangés et le mélange est séché sur du sulfate de calcium. On chasse le solvant sous vide jusqu'à l'obtention d'un résidu sec qui est redissous dans 2 cm³ d'alcool éthylique.

Séparation et dosage par chromatographie

A partir de la solution alcoolique précédemment obtenue, dans laquelle les constituants du vin sont concentrés 250 fois, le tyrosol et le tryptophol sont séparés par chromatographie descendante à une dimension sur papier Whatman n° 1, en mettant en œuvre des volumes rigoureusement mesurés, compris entre 1 et 5 µl. Comme solvant, on utilise le toluène-acétique précédemment décrit. La durée de développement est variable selon la substance considérée : 6 heures pour le tryptophol et 24 à 48 heures pour le tyrosol. Pour ce dernier corps, il importe de réaliser un développement suffisamment long, de façon à bien séparer le spot du tyrosol (Rf = 0,02) et celui de l'acide *p*-hydroxybenzoïque (Rf = 0,06).

Nous avons également utilisé la chromatographie sur couche mince de gel de silice, plus particulièrement pour la séparation du tryptophol ; cet alcool a un Rf de 0,5 en utilisant le mélange chloroforme, acide acétique (95 : 5) comme solvant.

La révélation des chromatogrammes est faite avec la *p*-nitraniline diazotée en milieu alcalin pour le tyrosol, avec la vanilline pour le tryptophol.

Pour doser le tryptophol et le tyrosol on compare directement, sur le chromato-

gramme, la dimension et l'intensité du spot correspondant à chacun de ces corps, avec ceux donnés par des gammes étalon préparées à partir des produits purs correspondants.

Les solutions de la gamme-étalon de tyrosol contiennent de 12,5 à 0,25 g par litre ; elles sont préparées à partir d'une solution-mère à 25 g par litre, diluée de 2 à 10 fois ; chacune de ces solutions correspond volume à volume à des extraits de vins (contenant eux-mêmes de 50 à 1 mg par litre de tyrosol) concentrés 250 fois.

Dans le cas du tryptophol, on part d'une solution-mère à 500 mg par litre, dilué de 2 à 20 fois. Les solutions de la gamme-étalon, contenant de 500 à 25 mg par litre, correspondent volume à volume à des extraits de vins (contenant eux-mêmes de 2 à 0,10 mg par litre de tryptophol) concentrés 250 fois.

Il est bien évident qu'un tel dosage, comme tous les dosages utilisant la chromatographie sur papier, doit être considéré comme une estimation semi-quantitative. Dans le cas du tyrosol, on peut considérer que sa teneur est donnée à 5 mg près ; cependant, nous avons constaté que le dosage permet de retrouver d'une façon satisfaisante une addition connue de cet alcool dans le vin.

En ce qui concerne le tryptophol, sa concentration est appréciée à 0,1 mg près.

DOSAGE DE L'ALCOOL PHÉNYLÉTHYLIQUE ET DE LA γ-BUTYROLACTONE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Pour extraire, à partir du vin, l'alcool phényléthylique et la γ-butyrolactone, nous avons employé la technique de Boidron (1966) basée sur le principe de l'extraction continue liquide-liquide. Le solvant utilisé peut être, soit un solvant léger comme le pentane, soit un solvant lourd comme le chlorure de méthylène. L'un et l'autre nous ont donné de bons résultats, à condition d'opérer avec un temps très long (240 heures).

L'ensemble de l'extrait est concentré par distillation ; on obtient finalement un extrait très concentré qu'on amène à un volume connu (1 ou 2 cm^3 à partir d'un litre de vin) et sur lequel sont réalisé les dosages. Nous avons constaté, à partir de solutions titrées d'alcool phényléthylique et de γ-butyrolactone, que l'extraction est quantitative.

La séparation de ces corps se fait par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes :

Colonne : acier inoxydable, diamètre 1/4 pouce
Température : 150°C en isotherme
Phase stationnaire : Chromosorb W 60-80 mesh, 10 p. 100 NPGA
Gaz vecteur : azote, débit 30 cm^3 par minute
Détecteur à ionisation de flamme
Volume injecté : de 0,1 à 1 µl.

Dans ces conditions, le pic de la γ-butyrolactone sort en 3 à 7 minutes, celui de l'alcool phényléthylique en 15 à 20 minutes (fig. 5) ; ce dernier pic est bien séparé et on peut ainsi effectuer des dosages relativement précis. Il n'en est pas de même pour

la γ-butyrolactone, dont le pic est quelquefois mal séparé de celui du succinate de diéthyle.

Le dosage de ces corps est effectué en comparant les chromatogrammes des extraits de vin avec ceux donnés par des solutions titrées de référence. On opère par comparaison des surfaces des pics, ou plus simplement par comparaison des hauteurs des pics, ce qui constitue une approximation suffisante.

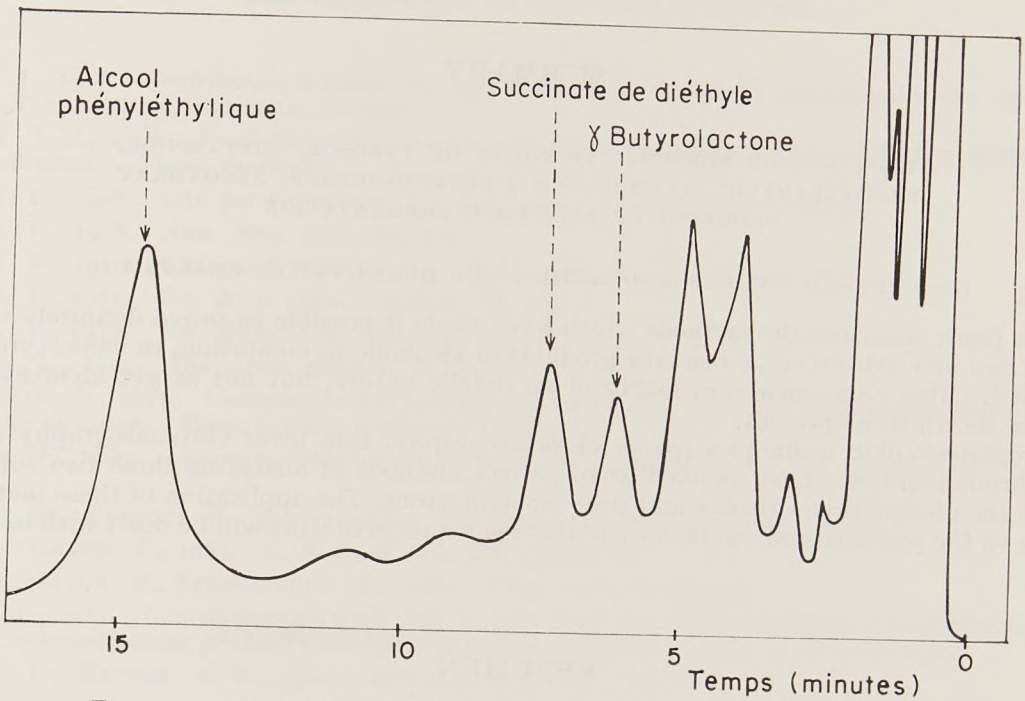


FIG. 5. — *Séparation de l'alcool phényléthylique et de la γ-butyrolactone par chromatographie en phase gazeuse*
(conditions opératoires cf. texte)

Pour la préparation d'une gamme étalon, dans le cas de l'alcool phényléthylique, on utilise une solution-mère à 100 g par litre diluée de 2 à 8 fois ; ceci correspond approximativement aux valeurs limites de la concentration en alcool phényléthylique dans le vin concentré 1 000 fois.

Pour doser la γ-butyrolactone, on prépare une gamme étalon à partir d'une solution-mère à 50 g par litre, diluée de 4 à 12 fois.

CONCLUSIONS

Les principales conclusions qui se dégagent de ce premier travail sont les suivantes :

1° Nous avons mis en évidence dans le vin deux corps nouveaux, produits secondaires de la fermentation alcoolique, le tyrosol et le tryptophol. Nous avons également montré la présence d'autres substances présentes en quantités appréciables, probablement de nature indolique et encore non identifiées ;

2° L'emploi des techniques de chromatographie (chromatographie sur papier, chromatographie sur couche mince et chromatographie en phase gazeuse) nous a

permis de mettre au point des méthodes de dosage du tyrosol et du tryptophol, également de l'alcool phényléthylique et de la γ-butyrolactone.

L'application de ces résultats à l'étude de la présence et de la signification de ces corps dans le vin sera exposée dans une autre publication.

Reçu pour publication en juillet 1969.

SUMMARY

STUDY OF THE PRESENCE IN WINES OF TYROSOL, TRYPTOPHOL, PHENYLETHYLIC ALCOHOL AND γ-BUTYROLACTONE, SECONDARY PRODUCTS OF ALCOHOLIC FERMENTATION

I. — IDENTIFICATIONS AND METHODS OF QUANTITATIVE ANALYSIS

This paper describes the methods which have made it possible to prove definitely the presence of two new substances, secondary products of alcoholic fermentation, in wine : tyrosol and tryptophol. Other components, probably of an indolic nature, but not as yet identified, have also been shown to be present.

Chromatographic techniques (paper chromatography, thin layer chromatography and gas liquid chromatography) have enabled us to perfect methods of analyzing these two substances and also the phenylethylic alcohol and the γ-butyrolactone. The application of these methods to research on the presence and significance of these substances in wine will be dealt with in another paper.

RESUMEN

ESTUDIO EN LOS VINOS DEL TIROSOL, DEL TRIPTOFOL, EL ALCOHOL FENILETILICO Y DE LA γ-BUTIROLACTONA, PRODUCTOS SECUNDARIOS DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

I. — IDENTIFICACIONES Y MÉTODO DE DOSIFICACIÓN

En este artículo se describen los métodos que han permitido hacer resalter de forma definitiva la presencia en el vino de dos cuerpos nuevos, productos secundarios de la fermentación alcohólica : el tirosol y el triptofol. Otras substancias, probablemente de carácter indólico y aún no identificadas, han sido también puestas en evidencia en cuanto a su acción.

El empleo de las técnicas de cromatografía (cromatografía sobre papel, cromatografía en capa fina y cromatografía en fase gaseosa) han permitido poner a punto los métodos de dosificación de estos dos cuerpos y, asimismo, del alcohol feniletílico y de la γ-butirolactona. La aplicación de estos métodos en el estudio de la presencia y de la significación de estos cuerpos en el vino será expuesta en otro número de esta publicación.

RIASSUNTO

STUDIO NEI VINI DEL TIROSOL, DEL TRIPTOFOL, DELL'ALCOOL FENILETILICO E DELLA γ-BUTIROLACTONA, PRODOTTI SECONDARI DELLA FERMENTAZIONE ALCOOLICA

I. — IDENTIFICAZIONE E METODI DI DOSATURA

Questo lavoro descrive i metodi che hanno permesso di mettere in evidenza in modo definitivo la presenza nel vino di due corpi nuovi, prodotti secondari della fermentazione alcoolica, tirosol e il triptofol. Altre sostanze, probabilmente di carattere indolico e non ancora identificate sono state egualmente messe in evidenza.

L'impiego delle tecniche di cromatografia (cromatografia su carta, cromatografia in strato sottile, cromatografia in fase gassosa) ha permesso di mettere al punto dei metodi di dosatura di questi due corpi, e, egualmente dell'alcool feniletilico e della γ-butirolactona. L'applicazione di questi metodi allo studio della presenza e del significato di questi corpi nel vino suranno esposti in un' altra pubblicazione.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Blouin J., 1966. *Contribution à l'étude des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins.* Thèse Docteur-Ingénieur, Bordeaux.

Boidron J.-N., 1966. *Essai d'identification des constituants de l'arôme des vins de* Vitis vinifera L. *Premiers résultats.* Thèse, Bordeaux.

Ehrlich. F., 1906. Cité par Genevois L. *Ind. agric. aliment.*, 1952, **1**, 27-32.

Ehrlich F., 1908. *Ann. Bras. Dist.*, **11**, 1-8.

Ehrlich F., 1910. Cité par Genevois L., *Ind. agric. aliment.*, 1952, **1**, 27-32.

Ehrlich F., 1911. *Ber. dtsch. chem. Gesellsch.*, **44**, 139.

Ehrlich F., 1912. *Ber. dtsch. chem. Gesellsch.*, **45**, 883.

Genevois L., 1952. *Ind. agric. aliment.*, **1**, 27-32.

Lafourcade S., 1955. *Contribution à l'étude des activeurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisin,* Thèse Docteur-Ingénieur, Bordeaux.

Lederer E., 1960. *Chromatographie en chimie organique et biologique,* t. II, 876 p., Masson et C^ie^ éditeur, Paris.

Nykanen L., Puputti E., Suomalainen H., 1966. *J. Inst. Brew.*, **72**, 24-28.

Ribéreau-Gayon P., 1963. *C. R. Acad. Sci.*, **256**, 4108-4111.

Ribéreau-Gayon P., Stonestreet E., 1966. *Chim. anal.*, **4**, 188-196.

Sapis J.-C., 1967. *Contribution à l'étude dans les vins du tyrosol, du tryptophol, de l'alcool phényléthylique et de la γ-butyrolactone, produits secondaires de la fermentation alcoolique.* Thèse, Bordeaux.

Webb A. D., Kepner R. E., 1962. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **13**, 1-14.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (3), 221-229.

ÉTUDE DANS LES VINS DU TYROSOL, DU TRYPTOPHOL, DE L'ALCOOL PHÉNYLÉTHYLIQUE ET DE LA γ-BUTYROLACTONE, PRODUITS SECONDAIRES DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

II. — Présence et signification

J.-C. SAPIS et P. RIBÉREAU-GAYON

Institut d'Œnologie,
Université de Bordeaux et Institut national de la Recherche agronomique
351, Cours de la Libération, 33-Talence.

SOMMAIRE

A l'aide des méthodes de dosage décrites dans l'article précédent, les auteurs ont étudié la formation de ces constituants au cours de la fermentation, leur présence dans le vin et leur évolution au cours du vieillissement ; enfin, leur intervention éventuelle dans les caractères organoleptiques est discutée.

INTRODUCTION

Nous avons exposé, dans une première publication, les méthodes qui nous ont permis d'identifier dans le vin le tyrosol et le tryptophol, également les méthodes de dosage de ces substances, de l'alcool phényléthylique et de la γ-butyrolactone.

Nous envisageons, dans ce nouveau travail, l'étude de la présence dans le vin de ces différentes substances et de leur évolution au cours du vieillissement.

Nous étudions aussi les conditions de formation de ces corps au cours de la fermentation, en envisageant plus particulièrement l'influence de la souche de levure et de l'alimentation azotée.

Enfin, dans un dernier paragraphe, nous cherchons à préciser l'influence du tyrosol et de l'alcool phényléthylique sur les caractères organoleptiques des vins.

Nous apportons ainsi un ensemble de résultats nouveaux et précis sur un sujet pour lequel on disposait uniquement d'hypothèses.

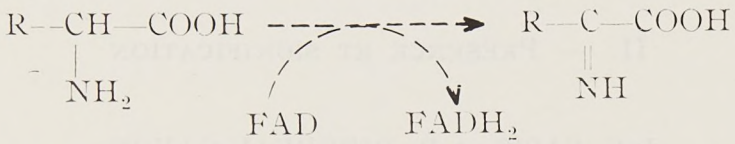
FORMATION AU COURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

Rappel du mécanisme de synthèse

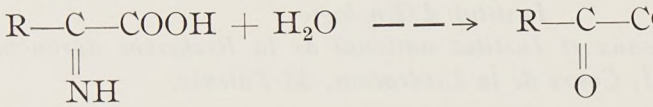
Ehrlich (1906) a décrit le processus qui, par désamination, décarboxylation et oxydoréduction, conduit aux alcools supérieurs à partir des aminoacides correspondants à $n + 1$ atomes de carbone.

Les étapes de cette transformation sont les suivantes :

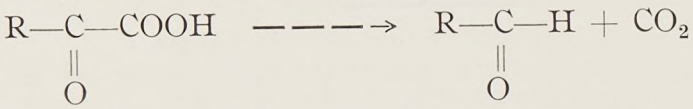
1° Déshydrogénation de l'aminoacide en iminoacide sous l'action du FAD :



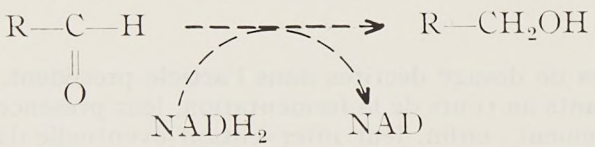
2° Désamination de l'iminoacide et formation d'un acide α-cétonique :



3° Décarboxylation de l'acide cétonique en aldéhyde à $n - 1$ atomes de carbone:



4° Réduction de l'aldéhyde en alcool sous l'action du $NADH_2$:



Genevois (1952) fait remarquer qu'un certain nombre de produits intermédiaires subsistent dans le milieu de fermentation et possèdent une grande importance dans l'arôme des vins. Plusieurs travaux ont été consacrés à l'étude de la formation du tyrosol, du tryptophol et de l'alcool phényléthylique au cours de la fermentation de divers milieux, mais il n'existait pas de résultats récents sur la fermentation des jus de raisin.

Formation au cours de la fermentation

On utilise 15 litres d'un jus de raisin stérilisé contenant 160 g de sucre par litre dont le taux est amené à 250 g par addition de glucose ; on ensemence avec un levain de *Saccharomyces oviformis* et on fait fermenter à 25°C en anaérobiose. Des échantillons de 1,5 litre sont prélevés à intervalles réguliers après homogénéisation ; ces échantillons sont analysés au moyen des méthodes décrites précédemment (tabl. 1).

Les résultats du tableau 1 montrent que la formation du tyrosol est continue et régulière pendant la période de fermentation. Cependant la fermentation des 50 derniers grammes de sucre est accompagnée de la synthèse de 16 mg de tyrosol, alors que 12 mg seulement ont été formés au début, lors de la fermentation de 200 g de sucre.

En ce qui concerne le tryptophol, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence sa formation au cours de cette expérience. La synthèse de ce corps est irrégulière et semble dépendre de facteurs encore non précisés.

TABLEAU I

Formation du tyrosol et de l'alcool phényléthylique au cours de la fermentation alcoolique

	Jours de fermentation						
	1	2	3	4	5	6	7
Sucre fermenté (g/l)	24	98	154	196	226	246	249
Tyrosol formé (mg/l)	2,5	5	8	12,5	20	25	28
Alcool phényléthylique formé (mg/l)	3	9,5	10,5	20	20,5	21	29

La formation d'alcool phényléthylique est importante, mais elle se fait de façon irrégulière en fonction du temps de fermentation. Ce résultat provient peut-être de l'hétérogénéité d'un milieu qui n'est pas agité en permanence ; en effet, nous avons tenu à nous placer dans les conditions qui rappellent, autant qu'il est possible, les conditions de la pratique.

Nous avons étudié également l'influence de la souche de levure sur la formation de ces corps. Pour cela nous avons ensemencé 1,5 litre d'un même moût de raisin stérilisé, au moyen de onze souches appartenant à des espèces différentes de levures rencontrées en vinification. La préparation des levains et l'ensemencement ont été réalisés, dans chaque cas, avec un mode opératoire identique. Nous avons effectué trois essais successifs, avec les mêmes conditions expérimentales : le moût est amené avant fermentation à la concentration de 250 g de sucre par litre ; la fermentation se fait à 25°C en anaérobiose.

Les résultats de ces expériences présentent certaines irrégularités difficilement interprétables. Un fait cependant est significatif : *Saccharomyces oviformis*, levure qui a le pouvoir alcoologène le plus élevé, est aussi celle qui forme la plus grande quantité de ces alcools. Dans un essai, on observe 33 mg par litre de tyrosol et 80 mg par litre d'alcool phényléthylique, alors qu'avec les dix autres souches les doses trouvées étaient comprises, respectivement, entre 5 et 25 mg par litre pour le tyrosol, 21 et 43 mg par litre pour l'alcool phényléthylique.

Également, ces essais ont confirmé l'irrégularité de la formation du tryptophol.

Influence de l'alimentation azotée

La formation de ces produits secondaires étant liée directement au métabolisme azoté de la levure, nous avons cherché à préciser l'influence de la nature du substrat azoté ajouté au milieu de fermentation ; pour cela nous avons fait fermenter à 25°C et en aérobiose cinq échantillons de 2,5 litres d'une même solution synthétique,

variant uniquement par la nature du substrat azoté, et de composition suivante (pour 1 l de solution) :

Glucose	175 g
Phosphate acide de potassium	2 g
Acide citrique	6 g
Substrat azoté	10 g
Solution de facteurs de croissance (LAFOURCADE, 1955)	10 cm^3

On amène à pH = 3,5 à l'aide d'une solution concentrée de potasse.

Les substrats azotés suivants ont été étudiés : phénylalanine, tyrosine, tryptophane, acide glutamique, sulfate d'ammonium.

TABLEAU 2

Formation du tyrosol, du trytophol et de l'alcool phényléthylique en fonction de la nature du substrat azoté

Solution synthétique à base de	Alcool phényl-éthylique formé (mg/l)	Tyrosol formé (mg/l)	Tryptophol formé (mg/l)
Phénylalanine	1 000	12,5	0
Tyrosine	35	500	0
Tryptophane	30	25	500
Acide glutamique	10	5	0,25
Sulfate d'ammonium	8	2,5	0

Le tyrosol, le tryptophol et l'alcool phényléthylique sont formés en quantité importante au cours de la fermentation des solutions synthétiques qui contiennent les aminoacides correspondants. Dans les autres cas, on trouve des quantités variables, de l'ordre de celles que l'on rencontre dans le vin.

Ces résultats montrent une relation directe entre la formation de ces alcools et la présence des aminoacides correspondants. Cependant, PEYNAUD et GUIMBERTEAU (1959) ont montré que le mécanisme de formation à partir des acides aminés correspondants ne permet pas d'expliquer entièrement la production d'alcools supérieurs, tout au moins dans le cas des alcools isoamylique et isobutylique, quantitativement les plus importants ; ceux-ci sont formés, pour une part, directement à partir de la molécule de sucre.

PRÉSENCE DANS LES VINS

Teneurs

Les teneurs trouvées dans différents vins de la région bordelaise sont rassemblées dans les tableaux 3 et 4.

Les vins contiennent de 15 à 45 mg/l de tyrosol avec une teneur moyenne de

25 mg/l. Il n'y a pas de différences significatives entre les vins vieux (c'est-à-dire de plus de deux ans d'âge) et ceux de 1964 qui, à l'époque du dosage, étaient des vins jeunes.

TABLEAU 3

Teneurs en tyrosol, en tryptophol, en alcool phényléthylique et en γ-butyrolactone de quelques vins rouges de la région de Bordeaux

(Dosages effectués en 1965)

	Tyrosol (mg/l)	Tryptophol (mg/l)	Alcool phényl-éthylique (mg/l)	γ-butyro-lactone (mg/l)
Saint-Émilion (vieux)	30	traces	—	—
Margaux (vieux)	27	0	—	—
Graves (vieux)	30	0	53	4,8
Margaux 1964	35	0,4	—	—
Puisseguin-Saint-Émilion 1964	24	0,2	—	—
1res côtes de Bordeaux 1964	18	0,8	58	0
Bergerac 1964	38	0,8	71,5	1,4
Fronsac 1964	45	0,8	—	—
Vin d'hybrides 1964	24	0,4	15	0
Quinsac (rosé) 1964	20	0	12	5,3

TABLEAU 4

Teneurs en tyrosol, en tryptophol, en alcool phényléthylique et en γ-butyrolactone de quelques vins blancs de la région de Bordeaux

(Dosages effectués en 1965)

	Tyrosol (mg/l)	Tryptophol (mg/l)	Alcool phényl-éthylique (mg/l)	γ-butyro-lactone (mg/l)
Bordeaux (vieux)	25	0	—	—
Graves 1 (vieux)	24	0	—	—
Graves 2 (vieux)	24	0	—	—
1res côtes de Bordeaux 1962	20	0	13,5	0,4
1res côtes de Bordeaux 1964	16	0,6	—	—
Bergerac 1964	28	0,2	74	1
Loupiac (vieux)	18	0	10	3,9
Barsac (vieux)	20	0	10	4,5
Sauternes (vieux)	20	0	—	—
Mousseux	24	0	20	5

Le tyrosol est légèrement moins abondant dans les vins blancs que dans les vins rouges. La teneur moyenne chez ces derniers est de 22 mg/l pour les vins blancs et de 29 mg/l pour les vins rouges. On notera cependant que le tyrosol est le seul constituant du vin à fonction phénol dont la concentration est du même ordre dans les vins blancs et dans les vins rouges ; c'est également le seul formé au cours de la fermen-

tation alcoolique. Les autres composés phénoliques proviennent des rafles, des pépins et des pellicules du raisin ; ils passent dans le vin lors de la macération de ces parties solides, que l'on cherche justement à éviter au maximum dans la vinification en blanc.

Le tryptophol est présent dans les vins en quantités toujours faibles. Les vins vieux sont les plus pauvres en tryptophol et, le plus souvent, n'en contiennent pas. Les vins blancs peuvent contenir du tryptophol ; il n'est donc pas entièrement exact de dire que le tryptophol est seulement présent dans les vins rouges, comme le pensaient certains auteurs (DENIGES *et al.*, 1931).

Les teneurs en alcool phényléthylique des divers échantillons, vins blancs ou vins rouges, varient dans d'importantes proportions ; il n'est pas possible de rattacher ces variations à un caractère quelconque, car le nombre des échantillons étudiés n'est pas suffisamment grand.

En ce qui concerne la γ-butyrolactone, les teneurs varient également de façon irrégulière. Certains échantillons de vins jeunes n'en contiennent pas, alors que les vins les plus vieux en renferment environ 5 mg/l. Cette augmentation de la teneur avec le vieillissement a été signalée par WEBB *et al.* (1963). Cependant, le nombre de nos analyses est encore insuffisant pour confirmer ce résultat de façon définitive.

Nous donnons des résultats moins nombreux dans le cas de l'alcool phényléthylique et de la γ-butyrolactone, parce que les méthodes de dosages, utilisant la chromatographie en phase gazeuse, sont longues et délicates.

Évolution au cours du vieillissement

Pour étudier l'influence du vieillissement sur les teneurs en tyrosol, en tryptophol et en alcool phényléthylique, nous avons choisi une série de vins rouges d'années différentes provenant du même vignoble.

Nous avons étudié sept vins rouges dont la durée du vieillissement s'étendait sur 12 années, de 1953 à 1965. Ces vins ont tous sensiblement le même degré alcoolique (tabl. 5).

TABLEAU 5

Teneurs en alcool éthylique, tyrosol, tryptophol et alcool phényléthylique de vins rouges d'un même vignoble de Bordeaux d'âges différents
(Dosages effectués en 1966)

	1953	1955	1957	1959	1962	1964	1965
Degré alcoolique (°G.L)	11,3	11,5	11,9	11,4	11,2	11,3	11,9
Tyrosol (mg/l)	18	18	10	25	10	18	28
Tryptophol (mg/l)	0	0	0	0	0	0	0
Alcool phényléthylique (mg/l)	51	44	52	65	52	58	41

D'après les résultats de cette expérience, les teneurs en tyrosol et en alcool phényléthylique ne semblent pas affectées par le vieillissement. En outre, il n'y a pas de relations évidentes entre les teneurs de ces deux alcools. On notera l'absence de tryptophol dans tous ces vins.

Influence sur les caractères organoleptiques

Afin d'étudier l'influence du tyrosol et de l'alcool phényléthylique sur les caractères organoleptiques des vins, nous avons ajouté des quantités croissantes de ces deux alcools dans de l'eau distillée d'une part, dans des vins blancs et rouges d'autre part. Nous nous sommes limités à ces deux alcools, car ils sont ceux qui, par leurs concentrations dans les vins, sont susceptibles de jouer le rôle le plus important sur l'arôme.

Tyrosol : On utilise deux doses : 50 mg/l et 500 mg/l.

Ajouté à l'eau distillée, l'influence du tyrosol est peu sensible ; à la dose de 500 mg/l on peut seulement détecter une très légère amertume, mais on ne retrouve pas l'arôme de miel du produit pur.

Ajouté au vin blanc à la dose de 50 mg/l, il n'a aucune influence ; le vin additionné de 500 mg/l (dix fois la dose normale) ne présente également pas un arôme plus accentué; cependant il est moins bon que le témoin, il paraît mâché, sans que l'on puisse rattacher cette diminution de qualité à un caractère particulier bien défini.

Ajouté au vin rouge, les conclusions sont les mêmes.

On peut donc conclure que l'influence du tyrosol sur l'arôme des vins, blancs ou rouges, est négligeable aux concentrations auxquelles on le rencontre.

Alcool phényléthylique : On utilise deux doses : 100 mg/l et 1 000 mg/l.

Dans l'eau distillée l'influence de l'addition de 100 mg/l est déjà sensible ; on distingue un arôme un peu âcre de verdure, qui ne rappelle pas l'odeur de rose du produit pur ; au goût, on retrouve cette âcreté avec une note piquante qui évoque le caractère brûlant de l'alcool pur. A la dose de 1 g/l, on retrouve les mêmes caractères fortement accentués.

Ajouté au vin blanc, à la dose de 100 mg/l, on observe la même odeur âcre et herbacée de l'alcool, ce qui ne correspond pas à une amélioration de l'arôme ; le goût n'est pas sensiblement modifié. Ajouté à la dose de 1 g/l, le vin est dénaturé.

Ajouté au vin rouge, les résultats sont les mêmes.

Ces résultats montrent donc que l'alcool phényléthylique doit jouer un rôle dans l'arôme, aux concentrations auxquelles il est présent dans les vins. Cependant, l'augmentation de la concentration communique un caractère âcre et herbacé qui n'améliore pas la qualité.

CONCLUSIONS

Les principales conclusions de ce travail sont les suivantes :

1° L'étude de la formation du tyrosol, du tryptophol et de l'alcool phényléthylique, montre que leur synthèse suit la disparition du sucre. Cependant la formation du tryptophol est irrégulière et semble dépendre de facteurs encore mal identifiés.

2° Parmi onze espèces de levures étudiées, *Saccharomyces oviformis* est celle qui forme la plus grande quantité de tyrosol et d'alcool phényléthylique.

3° La présence, dans le milieu de fermentation, de l'aminoacide correspondant à chaque produit secondaire influe de manière prépondérante sur sa formation. En

présence d'une grande quantité de cet aminoacide, constituant la seule source d'azote, la production de l'alcool secondaire peut être décuplée ou même, comme dans le cas du tryptophol, multipliée par 100.

4° Le tyrosol est toujours présent dans les vins blancs comme dans les vins rouges à des concentrations variant relativement peu, de 15 à 45 mg par litre, avec une moyenne de 25 mg par litre. Il n'est pas affecté par le vieillissement.

5° Le tryptophol est présent dans le vin, à l'état de traces et de façon irrégulière ; sa concentration est inférieure à 1 mg/l.

6° L'alcool phényléthylique est présent dans les vins blancs comme dans les vins rouges à des teneurs qui varient dans de larges limites, de 10 à 75 mg par litre. Le vieillissement n'a pas d'influence sur la teneur des vins en alcool phényléthylique.

7° La teneur en γ-butyrolactone varie de 0 à 5 mg/l ; elle semble augmenter au cours du vieillissement.

8° Le tyrosol et l'alcool phényléthylique doivent avoir une influence relativement faible sur les caractères organoleptiques. L'addition de 100 mg/l d'alcool phényléthylique au vin lui communique un caractère âcre et herbacé ; l'addition de 50 mg/l de tyrosol est sans effet.

Reçu pour publication en juillet 1969.

SUMMARY

STUDY OF THE PRESENCE IN WINES OF TYROSOL, TRYPTOPHOL, PHENYLETHYLIC ALCOHOL AND γ-BUTYROLACTONE, SECONDARY PRODUCTS OF ALCOHOLIC FERMENTATION

II. — PRESENCE AND SIGNIFICANCE

The formation of tyrosol, tryptophol, phenylethylic alcohol and γ-butyrolactone during alcoholic fermentation follows closely on the disappearance of the sugar. The nature of the species of yeast influences this formation.

The synthesis of these substances by yeast is achieved at the expense of the amino-acids ; the addition of different amino-acids to a synthetic fermentation medium greatly increases the formation of the corresponding secondary alcohols.

Wine contains from 15 to 45 mg/l of tyrosol, 0 to 1 mg/l of tryptophol, 10 to 75 mg/l of phenylethylic alcohol, and 0 to 5 mg/l of γ-butyrolactone.

There is no significant difference between the content of white wines and red wines. Furthermore, the content of γ-butyrolactone increases as the wine ages, while the other alcohols remain constant.

Tyrosol and phenylethylic alcohol evidently affect the organoleptic qualities relatively little.

RESUMEN

ESTUDIO EN LOS VINOS DEL TIROSOL, DEL TRIPTOFOL, DEL ALCOHOL FENILETILICO Y DE LA γ-BUTIROLACTONA, PRODUCTOS SECUNDARIOS DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA

II. — PRESENCIA Y SIGNIFICADO

La formación de tirosol, de triptofol, de alcohol fenietílico y de γ-butirolactona durante el transcurso de la fermentación alcohólica sigue estrechamente la desaparición del azúcar. El género de la especie de levadura que interviene tiene una influencia certera sobre esta formación pero también intervienen otros factores, aún desconocidos.

La síntesis de estos cuerpos por la levadura se hace a expensas de los aminoácidos. La adición en un medio de fermentación sintética, de los distintos aminoácidos, incrementa en fuerte proporción la formación de los alcoholes secundarios correspondientes.

El vino contiene de 15 a 45 mg/l de tirosol, de 0 a 1 mg/l de triptofol, de 10 a 75 mg/l de alcohol feniletílico y de 0 a 5 mg/l de γ-butirolactona. No se acusa una diferencia significativa entre el contenido de los vinos blancos y de los vinos tintos. Por otra parte, el contenido en γ-butirolactona aumenta durante el transcurso del envejecimiento, mientras que los demás alcoholes permanecen constantes.

El tirosol y el alcohol feniletílico deben tener una influencia relativamente reducida sobre los caracteres organolépticos.

RIASSUNTO

STUDIO NEI VINI DEL TIROSOL, DEL TRIPTOFOL, DELL'ALCOOL FENILETILICO E DELLA γ-BUTIROLATTONA, PRODOTTI SECONDARI DELLA FERMENTAZIONE ALCOOLICA

II. — PRESENZA E SIGNIFICATO

La formazione di tirosol, di triptofol, d'alcool feniletilico e di γ-butirolactona nel corso della fermentazione alcoolica segue strettamente la sparizione dello zucchero. la natura della specie di lievito che interviene ha un' influenza accertata su questa formazione, ma altri fattori, ancora sconosciuti intervengono egualmente.

La sintesi di questi corpi fatta dal lievito si realizza a spese degli aminoacidi, accresce fortemente la formazione degli alcooli secondari corrispondenti.

Il vino contiene da 15 a 75 mg/l di tirosol, da 0 a 1 mg/l di triptofol, da 10 a 75 mg/l di γ-butirolactone. Non e una differenza significativa tra il tenore dei vini bianchi e dei vini rossi : d'altra parte il tenore in γ-butirolactone aumenta nel ocorso dell'invecchiamento, allorche gli altri alcooli restano costanti.

Il tirosol e l'alcool feniletilico devono avere un'influenza relativamente debole sui caratteri organolettici.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DENIGES G., CHELLE L., LABAT A., 1931. *Chimie analytique*, tome II, Éd. Norbert Maloine, Paris.

EHRLICH F., 1906. Cité par GENEVOIS L., *Ind. agric. aliment*, 1952, **1**, 27-32.

GENEVOIS L., 1952. *Ind. agric. aliment*, **1**, 27-32.

LAFOURCADE S., 1955. *Contribution à l'étude des activeurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisin*, Thèse Docteur-Ingénieur, Bordeaux.

PEYNAUD E., GUIMBERTEAU G., 1959. *C. R. Acad. Sci.*, **248**, 868.

WEBB A. D., RIBÉREAU-GAYON P., BOIDRON J.-N., 1963. *C. R. Acad. Agric.*, **69**, 1415-1470.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (3), 231-235.

NOTE DE LABORATOIRE

REMARQUES SUR LE BILAN D'OXYDATION DU GLUCOSE ET DE L'ACIDE PYRUVIQUE PAR LA LEVURE

A. ARNAUD, J. ALBERT, P. GALZY et R. BRU

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Génétique,
École nationale supérieure agronomique,
Centre de Recherches de Montpellier
Institut national de la Recherche agronomique

INTRODUCTION

Des suspensions de cellules de levure non proliférantes oxydent entièrement l'éthanol dans certaines circonstances. Dans les mêmes conditions d'expériences, une stimulation de l'oxydation des réserves cellulaires en présence d'éthanol a été mise en évidence par C. BIZEAU et P. GALZY (1965). Il en résulte un bilan d'oxydation apparent supérieur à l'unité. Dans ces expériences, la levure était cultivée au préalable sur un milieu synthétique contenant 2 p. 100 de glucose. L'acide acétique a une action analogue à celle de l'éthanol dans les mêmes conditions expérimentales. C. BIZEAU et P. GALZY (1965) ont observé également, dans le cas de l'acide acétique, un bilan d'oxydation qui semble supérieur à l'unité.

M. MAGAGNOSC, P. GALZY et J. ALBERT (1968) ont montré que les bilans d'oxydation de l'éthanol ou de l'acide acétique présentaient des valeurs très variables selon les conditions de croissance préalable des cellules de levure. Les cellules de levure cultivées au préalable sur un milieu synthétique riche en glucose (2 p. 100) oxydent entièrement ces deux substrats ; la respiration de l'éthanol et de l'acide acétique s'effectue grâce à un couplage avec l'oxydation des réserves de la cellule ; il en résulte un bilan d'oxydation apparent supérieur à l'unité. Par contre, les cellules cultivées sur des milieux pauvres en glucose n'oxydent que partiellement l'éthanol et l'acide acétique. Il est possible que les réserves glucidiques de la cellule soient dans ce cas insuffisantes pour assurer le couplage nécessaire à l'oxydation totale.

Ces observations soulèvent deux problèmes. Le couplage de l'oxydation des réserves avec celle du substrat peut-il être observé dans d'autres cas, ou est-il une propriété particulière de l'éthanol et de l'acide acétique? Le bilan de l'oxydation est-il fonction de la nutrition des cellules pour tous les substrats? Si cette dernière hypothèse était vérifiée, la mesure du bilan d'oxydation d'un substrat par les cellules de levure aurait une valeur très limitée. Nous avons mesuré les bilans de l'oxydation du glucose et de l'acide pyruvique par des cellules de levure cultivées sur des milieux très différents. Ce travail apporte ainsi la réponse aux deux questions que nous avons posées.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — *Matériel biologique*

Toutes les expériences ont été réalisées avec une souche haploïde de *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN : 6153/C9. Cette souche exige pour sa croissance : uracile, adénine et histidine. Ces facteurs de croissance ont été rajoutés dans tous les milieux synthétiques. La souche 6153/C9 est celle précédemment utilisée par M. MAGAGNOSC, P. GALZY et J. ALBERT (1968).

B. — *Milieux de culture*

Un milieu naturel à base d'extrait de levure Difco (0,5 p. 100) est utilisé. Il reçoit comme élément carboné soit l'éthanol 1 p. 100, soit le glucose 0,5 p. 100, soit le glucose 2 p. 100.

Le milieu synthétique de P. GALZY et P. SLONIMSKI (1957) est également utilisé. Il est appelé par abréviation milieu G. Sa préparation a été décrite en détail par P. GALZY (1964). Il reçoit les mêmes substrats carbonés que le milieu précédent.

Toutes les cultures sont effectuées en erlenmeyers remplis au dixième de leur volume et agités (75 oscillations/mn, amplitude 8 cm).

C. — *Techniques manométriques*

Les techniques manométriques sont effectuées suivant la méthode classique de Warburg. Les détails expérimentaux ont été déjà décrits par M. MAGAGNOSC, P. GALZY et J. ALBERT (1968).

Dans toutes les expériences, les deux substrats ont été utilisés aux concentrations de 0,38 mM, 0,57 mM, 0,76 mM, 0,95 mM et 1,14 mM, ce qui représente respectivement dans les cupules 680, 1 020, 1 360, 1 700, 2 040 mμ moles. Les mesures sont poursuivies jusqu'à ce que l'absorption d'oxygène soit identique dans les cupules d'expériences ayant reçu du substrat et dans la cupule témoin qui n'en a pas. La réaction d'oxydation du substrat est alors terminée ; la partie qui n'est pas oxydée peut être, soit incorporée dans les réserves, soit sous forme d'un produit intermédiaire qui s'est accumulé. Le bilan est le rapport entre le volume d'oxygène absorbé effectivement et le volume d'oxygène théoriquement nécessaire pour l'oxydation totale du substrat.

II. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET DISCUSSION

Le calcul du bilan peut être réalisé individuellement pour chaque cupule : la quantité d'oxygène utilisée pour l'oxydation du substrat est estimée en enlevant à l'absorption de la cupule d'expérience l'absorption d'une cupule témoin ne contenant pas de substrat et ayant donc servi à mesurer la respiration endogène. Ce mode de calcul n'est valable que si le substrat ne modifie pas la vitesse de respiration des réserves. L'absorption d'oxygène correspondant à l'oxydation des réserves (respiration endogène) est très élevée ; dans ce genre d'expérience, elle est beaucoup plus élevée que l'absorption due à l'oxydation du substrat. Une erreur de mesure de la respiration endogène a donc un effet considérable sur la précision du résultat final du calcul. Pour chacun des 2 substrats, 72 mesures ont été ainsi effectuées ; dans aucun cas, il n'a été observé de bilans apparemment supérieurs à l'unité.

Une représentation graphique des résultats a été effectuée en portant en ordonnées l'absorption totale d'oxygène exprimée en μl, et en abscisses l'absorption théorique correspondant à l'oxydation totale du substrat dans la cupule (fig. 1). L'intrapolation graphique permet d'estimer le bilan d'oxydation avec une bonne précision puisqu'il est tenu compte de plusieurs résultats expérimentaux L'extrapolation au zéro indique la valeur de la respiration endogène en présence du substrat ; il est possible de la comparer à la respiration des réserves en l'absence de substrat mesurée expérimentalement.

Pour plus de précision, la droite de régression $y = a(x - \bar{x}) + b$ peut être calculé : x est la quantité d'oxygène exprimée en µl correspondant à l'oxydation totale du substrat dans la cupule ; y est la quantité d'oxygène absorbée, corrigée de l'activité due aux substrats endogènes ; a est le

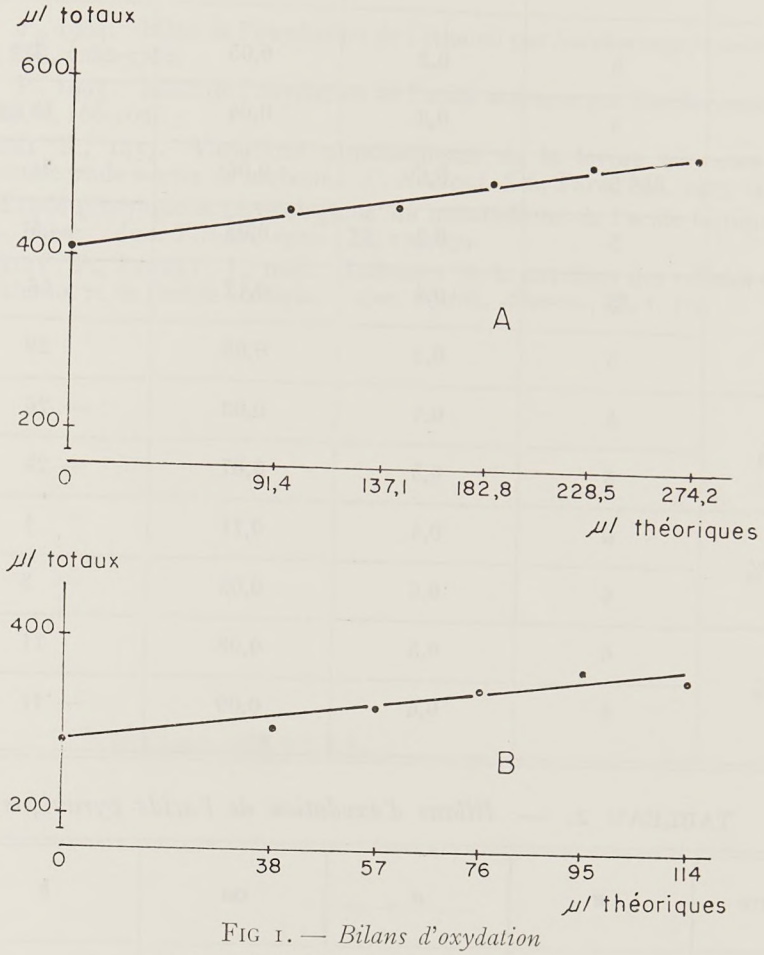


FIG 1. — *Bilans d'oxydation*
A — Glucose B — acide pyrurique

bilan d'oxydation ; b est la différence entre les activités endogènes en présence et en absence de substrat. Le tableau 1 donne les résultats obtenus dans le cas du glucose pour 12 expériences indépendantes. Le tableau 2 donne les mêmes données dans le cas de l'acide pyruvique.

Comme pour beaucoup d'autres coefficients métaboliques de la levure, les valeurs trouvées varient beaucoup ; pour des conditions expérimentales apparemment identiques, elles peuvent même être significativement différentes. Il faut donc comparer plusieurs résultats indépendants pour chaque type de milieu différent. Dans les tableaux 1 et 2, aucune différence n'apparaît entre les divers milieux de culture. Par conséquent, le bilan d'oxydation ne dépend pas des conditions de culture préalable des cellules, ou, tout au moins, ne varie pas plus pour des cellules cultivées sur des milieux différents, que pour des cellules cultivées sur un même milieu lors d'expériences indépendantes.

Les valeurs de b (tabl. 1 et 2) sont tantôt positives et tantôt négatives. Même si, dans certains cas, b est significativement différent de zéro, il n'est pas possible de considérer que les différences observées entre les respirations endogènes, en présence et en absence de substrat, ont une signification biologique.

En résumé, les phénomènes observés avec l'acide acétique et l'éthanol sont bien spécifiques de ces substrats. Ils ne se retrouvent pas avec le glucose et l'acide pyruvique. En aucun cas, il n'a été observé de bilan apparemment supérieur à l'unité ; aucune action du glucose et de l'acide pyruvique sur l'oxydation des réserves de la cellule n'a été mise en évidence par la détermination du bilan d'oxydation.

TABLEAU I. — *Bilans d'oxydation du glucose*

Milieux de culture	*n*	*a*	σ*a*	*b*	σ*b*
G glucose 2 %	5	0,2	0,05	1	3
	5	0,3	0,04	18	3
G glucose 0,5 %	5	0,6	0,06	— 31	4
	5	0,2	0,08	4	5
G éthanol 1 %	5	0,8	0,17	— 66	11
	5	0,2	0,06	29	4
YE glucose 2 %	5	0,4	0,03	— 26	2
	6	0,5	0,07	— 24	6
YE glucose 0,5 %	6	0,4	0,11	1	8
	6	0,5	0,05	3	4
YE éthanol 1 %	6	0,5	0,08	11	6
	6	0,6	0,09	— 11	7

TABLEAU 2. — *Bilans d'oxydation de l'acide pyruvique*

Milieux de culture	*n*	*a*	σ*a*	*b*	σ*b*
G glucose 2 %	5	0,3	0,07	5	2
	5	0,5	0,28	16	8
G glucose 0,5 %	5	0,4	0,04	3	1
	5	0,7	0,54	— 7	5
G éthanol 1 %	5	0,6	0,21	7	4
	5	0,1	0,25	38	7
YE glucose 2 %	6	0,6	0,08	— 8	3
	6	0,8	0,16	— 13	5
YE glucose 0,5 %	6	0,8	0,20	0	6
	6	0,4	0,10	9	3
YE éthanol 1 %	6	0,6	0,10	9	4
	6	0,5	0,11	25	4

Reçu pour publication en avril 1969.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIZEAU C., GALZY P., 1964. Bilan de l'oxydation de l'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **258**, 5280-5282.

BIZEAU C., GALZY P., 1965. Bilan de l'oxydation de l'acide acétique par *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *C. R. Soc. Biol.*, **159**, 1, 166-169.

GALZY P., SLONIMSKI P., 1957. Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **245**, 2423-2426.

GALZY P., 1964. Étude génétique et physiologique du métabolisme de l'acide lactique chez *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. Thèse *Ann. Technol. agric.*, **13**, 109-259.

MAGAGNOSC M., GALZY P., ALBERT J., 1968. Influence de la nutrition des cellules de levure sur le bilan d'oxydation de l'éthanol et de l'acide acétique. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **22**, 1, 1-9.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (3), 237-240.

NOTE DE LABORATOIRE

SÉPARATION DES ACIDES AMINÉS PAR CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE EN COUCHE MINCE SUR FILM

J. MAUGENET et Marie-Laure DALMEYDA

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

Les acides aminés sont couramment identifiés et déterminés quantitativement par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions couplée avec un analyseur automatique dont les principes ont été décrits dans les travaux de SPACKMAN, STEIN et MOORE (1958).

Parmi les méthodes d'analyse qualitative, la chromatographie bidimensionnelle sur papier a permis de nombreux progrès dans l'étude des acides aminés des milieux biologiques, mais son inconvénient majeur reste toujours sa lenteur ; l'utilisation de couches minces de cellulose sur support de verre permet de réduire ce délai et d'augmenter la sensibilité de cette méthode. Quelques auteurs (WOLLENWEBER, 1962 ; HORTON, TANIMURA et WOLFROM, 1966) ont mis à profit cette amélioration pour réaliser des séparations plus rapides d'acides aminés ; cependant, l'équipement de base nécessaire et, parfois, les difficultés de préparation et de stockage des plaques, en font encore une technique propre à des laboratoires spécialisés.

La chromatographie en couche mince sur film permet d'éliminer ces inconvénients : les couches sont prêtes à l'emploi, robustes et d'un coût peu élevé. Comme, d'une part, le pouvoir de résolution de la couche mince est accru et que, d'autre part, la durée de développement est très faible, nous avons mis en œuvre cette technique de séparation dans l'étude des acides aminés des levures.

I. — MÉTHODE UTILISÉE

Films chromatographiques

Ils proviennent des Éts Kodak et sont commercialisés sous le nom de « Eastman Chromagram Sheet », type ECS 6064, couche organique de cellulose.

Solvants

Pour le développement, on utilise :
première direction (solvant 1) : méthanol-eau-pyridine (4 : 1 : 2, vol. à vol.)
deuxième direction (solvant 2) : éthanol-1.butanol-eau-acide propionique (5 : 5 : 2,5 : 1, vol. à vol.).
La pyridine doit être fraîchement distillée.

Séparation

On utilise un film chromatographique de format 10 × 10 cm, préalablement activé pendant 30 minutes à l'étuve à 100°C, refroidi, lavé par ascension du solvant 1 et séché soigneusement par ventilation à température ambiante. Les cuves sont d'un modèle courant, parallélipipédique à couvercle rodé.

La tache de départ est faite dans un angle à 15 mm de chaque côté et le dépôt s'effectue par fraction de 0,25 µl à l'aide d'une micro-seringue ; la concentration ne doit pas être supérieure à 10 µg pour une prise d'essai de 5 µl.

Les solutions standards des 15 acides aminés testés ont une concentration de 2 µg/µl et pour le chromatogramme témoin on dépose :

— 2 µl, soit 4 µg, du mélange leucine, isoleucine, valine, arginine, phénylalanine, histidine, thréonine, lysine, alanine, acide aspartique et acide glutamique.

— 3 µl, soit 6 µg, du mélange méthionine, cystine, tyrosine et tryptophane qui ont une réaction colorée moins intense.

Le film est introduit dans une cuve saturée, contenant le solvant 1 sur une épaisseur d'environ 5 mm ; le temps d'ascension pour la hauteur totale est de 25 à 30 minutes. Après l'avoir retiré, puis séché par ventilation à température ambiante, il est placé selon le sens de la deuxième direction (perpendiculaire à celui du premier développement), dans une cuve saturée contenant le solvant 2 sur une hauteur de 5 mm ; la durée d'ascension est alors de 40 à 45 minutes.

Le chromatogramme subit un dernier séchage par ventilation à température ambiante avant a révélation des taches.

Révélation

Elle est effectuée par pulvérisation d'une solution de :

Ninhydrine	2 g
Collidine	6 ml
Éthanol absolu q.s.p.	100 ml

Ce réactif peut se conserver à l'abri de la lumière et au froid pendant une semaine.

Après pulvérisation (environ 10 ml pour la plaque 10 × 10 cm), le chromatogramme est placé immédiatement dans une étuve à 100°C ; les taches qui apparaissent au bout de 3 à 5 minutes sur fond blanc bleuté sont :

Bleues pour la thréonine, valine, leucine + isoleucine, phénylalanine, lysine, arginine, alanine.
Gris rose pâle pour la cystine.
Mauve pour la méthionine, histidine, tyrosine et acide glutamique.
Bleu gris pour le tryptophane.
Bleu turquoise pour l'acide aspartique.

Une amélioration de cette technique, permettant de supprimer la pulvérisation, consiste à incorporer la ninhydrine dans le deuxième solvant à la concentration de 0,2 g pour 100 ml. Nous déconseillons cependant ce procédé, car le fond est irrégulier.

II. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

La figure 1 représente la photographie d'un chromatogramme sur lequel on a effectué la séparation d'un mélange d'acides aminés témoins par la technique que nous venons de décrire; l'identification de ces acides aminés est portée sur la figure 2 et leurs Rf dans le tableau 1.

Le choix de ces 15 acides aminés a été fixé en raison des études que nous poursuivons sur les levures alimentaires ; ils représentent la plupart des acides aminés que l'on rencontre dans un extrait de levure.

Par cette méthode, il n'est pas possible de séparer la leucine de l'isoleucine ; de même, les taches d'arginine et de lysine sont pratiquement confondues, la limite entre elles n'étant pas toujours très facile à déterminer. Elle présente, cependant, des avantages de rapidité et de mise en

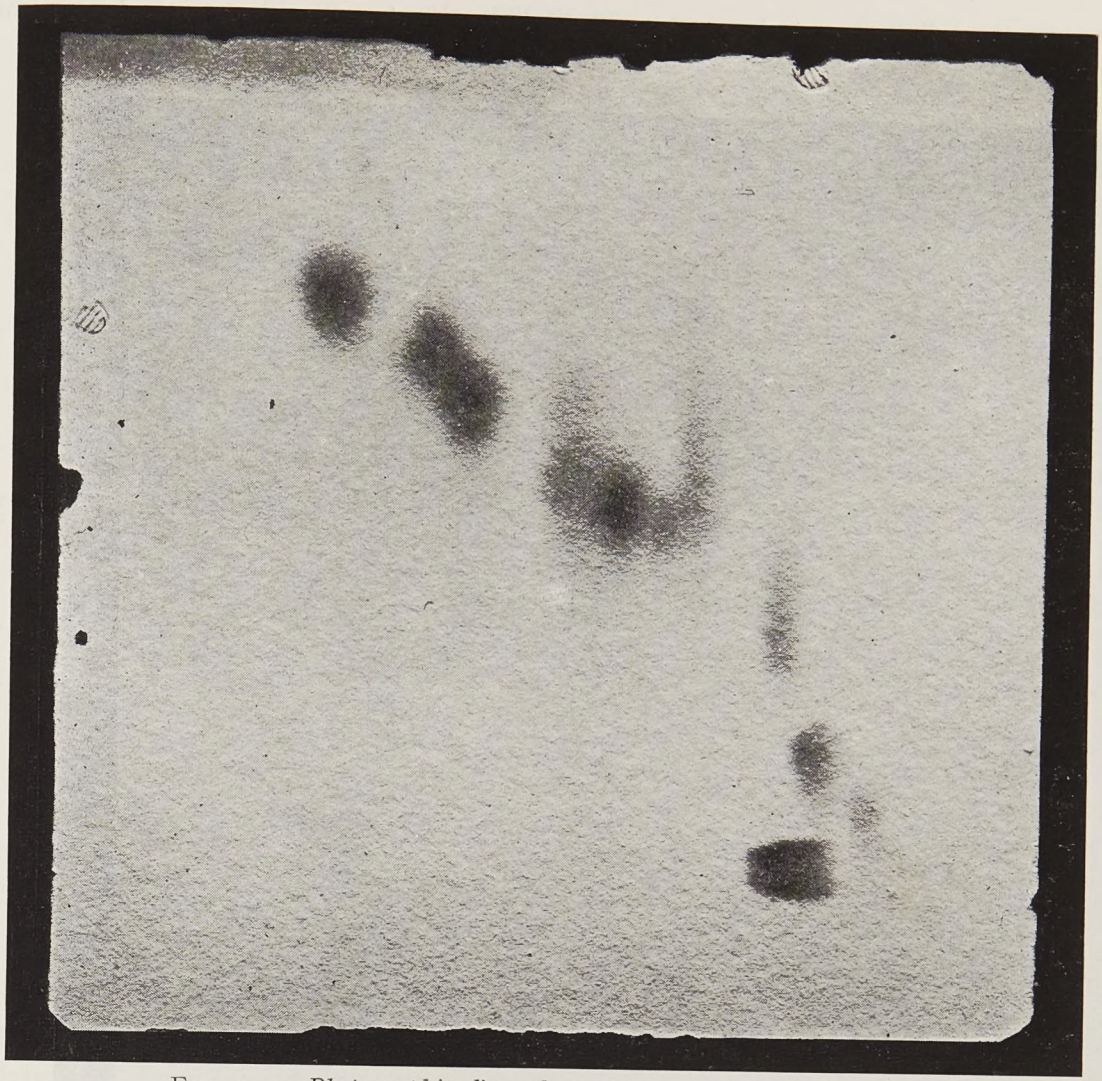


FIG. 1. — *Photographie d'un chromatogramme en grandeur naturelle*

TABLEAU I — *Rf des acides aminés de la solution standard*

Acide aminé	Solvant 1 Méthanol-eau-pyridine (4 : 1 : 2) Rf	Solvant 2 Éthanol-butanol-eau-acide propionique (5 : 5 : 2,5 : 1) Rf
Alanine	0,46	0,32
Arginine + Lysine	0,018	0,12
Aspartique (acide)	0,33	0,13
Cystine	0,08	0,03
Glutamique (acide)	0,51	0,23
Histidine	0,15	0,10
Isoleucine + Leucine	0,70	0,67
Méthionine	0,49	0,37
Phénylalanine	0,58	0,51
Thréonine	0,44	0,27
Tryptophane	0,61	0,56
Tyrosine	0,58	0,38
Valine	0,65	0,53

œuvre permettant d'effectuer un bon test qualitatif d'identification d'acides aminés dans un milieu biologique.

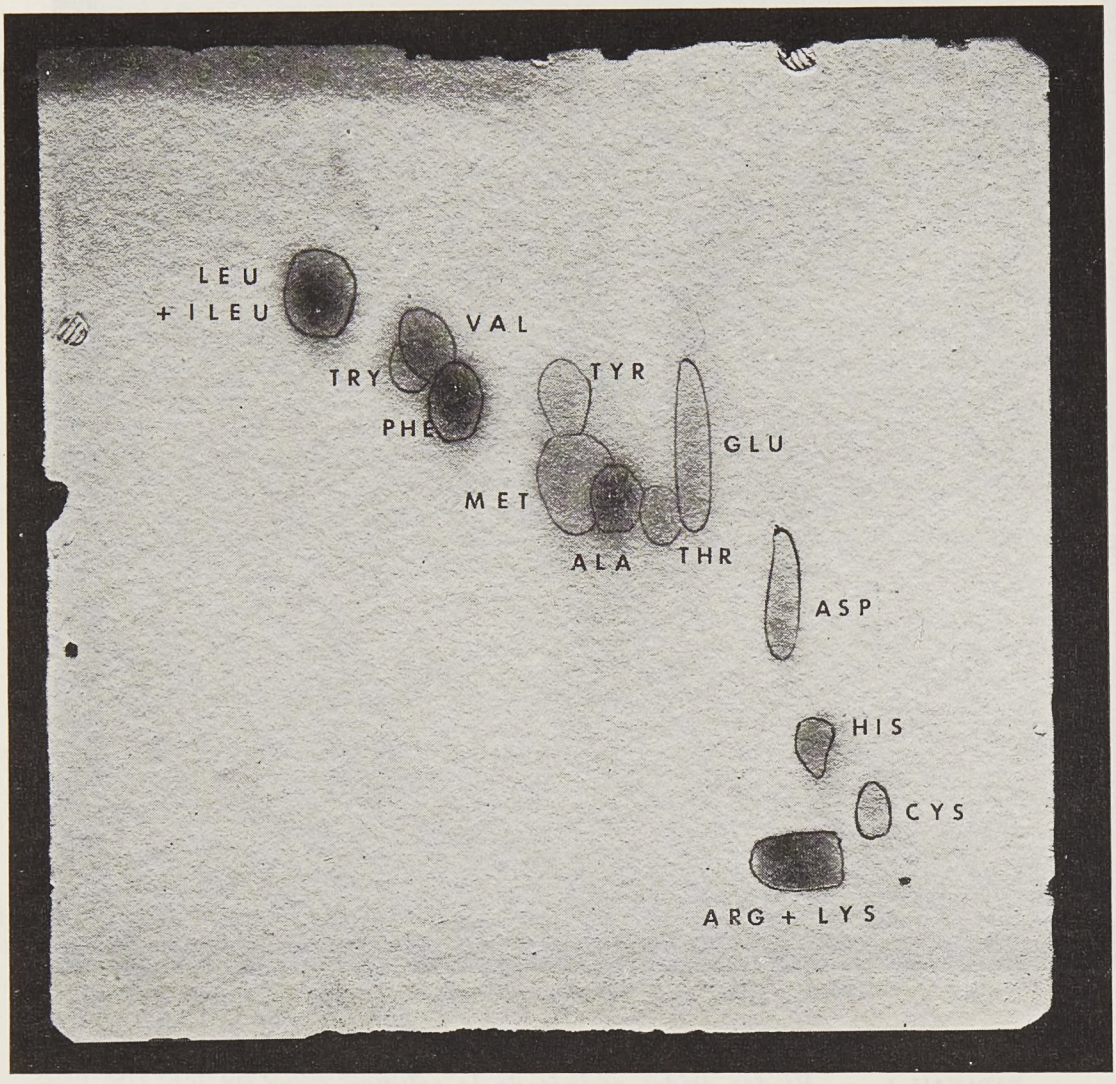


FIG. 2. — *Identification des acides aminés du chromatogramme témoin*

Dans notre laboratoire, nous appliquons cette technique pour l'étude des acides aminés libres du « pool » des levures et des hydrolysats chlorhydriques de leurs protéines. Les séparations sont identiques à celle obtenue pour la solution témoin et nous obtenons une bonne corrélation avec les analyses effectuées par un « Autoanalyseur technicon ». Cette chromatographie qualitative sur film est en quelque sorte une chromatographie préparatoire qui nous permet de sélectionner les extraits les plus intéressants pour l'analyse quantitative.

Reçu pour publication en juin 1969.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

HORTON D., TANIMURA A., WOLFROM M. L., 1966. Two-dimensional thin-layer chromatography of amino acids on microcrystalline cellulose. *J. Chromatogr.*, **23**, 309-312.

SPACKMAN D. H., STEIN W. H., MOORE S., 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, **30**, 7, 1190-1206.

WOLLENWEBER P., 1962. Dünnschicht-chromatographische Trennungen von Aminosäuren an Cellulose-Schichten. *J. Chromatogr.*, **9**, 369-371.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (3), 241-247.

NOTE TECHNIQUE

EXTRACTION DES COMPOSÉS VOLATILS EN SOLUTIONS HYDROALCOOLIQUES PAR DÉMIXTION AVEC DES SELS

P. DUBOIS

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches de Dijon
Institut national de la Recherche agronomique

I. — INTRODUCTION

L'analyse des composés volatils par chromatographie en phase gazeuse suppose tout d'abord leur extraction. Dans le cas des boissons, fermentées ou non, il existe deux méthodes qui permettent l'obtention d'échantillons analysables : l'entraînement par les gaz et le piégeage au froid pour la recherche des composés possédant en solution aqueuse une constante de volatilité suffisamment élevée, et l'extraction par solvant pour la recherche des composés à plus faibles constantes de volatilité. Cette dernière technique est généralement longue parce qu'il se forme des émulsions et que les composés à extraire ont de faibles coefficients de partage entre les phases aqueuse et organique. L'essentiel était donc la recherche de systèmes qui présentent, à l'équilibre et pour un soluté donné, une valeur élevée du coefficient de partage, c'est-à-dire du rapport :

$$\frac{\text{Concentration dans la phase organique}}{\text{Concentration dans la phase aqueuse}}.$$

Une première amélioration consiste à diminuer le pouvoir solvant de la phase aqueuse par saturation par un électolyte fort, soit par exemple du chlorure de sodium, ou mieux par un sel dont l'anion est bi- ou trivalent. Une deuxième amélioration consiste à modifier la nature du solvant et à utiliser, par exemple, de l'éthanol, qui est miscible à l'eau, mais peut être séparé en provoquant une démixtion par un sel approprié. L'étude des diagrammes de phase du système eau-éthanol-sulfate d'ammonium faite par SINGLETON (1961) montre bien tous les avantages d'un tel procédé : la phase hydroalcoolique, riche en éthanol, qui est séparée par le sel a, vis-à-vis des substances à extraire, un pouvoir solvant bien supérieur à celui de la phase hydroalcoolique riche en eau et en sel.

Cette technique, telle qu'elle a été utilisée par SINGLETON, essentiellement en vue de l'extraction des matières colorantes du vin, exige l'addition d'une légère quantité d'éthanol et mène à la séparation d'une phase organique riche en composés non volatils. C'est pourquoi elle est difficilement utilisable telle quelle pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Nous avons remarqué que si l'on sature, par du sulfate d'ammonium, du vin dans lequel on a préalablement dissous 1 à 2 p. 100 (en volumes) d'éther diéthylique, il apparaît bientôt deux phases dont l'une, organique, est très semblable à celles décrites par SINGLETON. Il semble d'ailleurs que l'ordre d'addition du sel et de l'éther diéthylique ne soit pas indifférent, et que l'équilibre soit plus vite atteint lorsque le sel provoque la démixtion du mélange solvant. Quoi qu'il en soit, la phase organique ainsi obtenue contient de l'éther, et il est possible de la traiter par un égal volume d'eau saturée de chlorure de sodium. On obtient alors deux nouvelles phases : l'une hydroalcoolique qui retient la majeure partie des substances non volatiles, l'autre éthéroalcoolique riche en composés volatils. Une fraction de cette dernière peut être injectée directement dans l'appareil d'analyse. Pour expliciter ce résultat et tenter de trouver des conditions d'extraction optimum, on a étudié systématiquement les systèmes eau-éther diéthylique-alcool, soit seuls, soit saturés par un sel. On s'est limité à deux alcools : l'éthanol et l'isopropanol, et à trois sels : le chlorure de sodium, le phosphate monosodique et le sulfate d'ammonium. Une fois en possession des diagrammes de phases, il devenait indispensable de mesurer les coefficients de partage dans les différents systèmes, pour un soluté donné. Ce soluté devait se trouver dans les mélanges quaternaires étudiés en quantités suffisamment faibles pour ne pas influer sur la composition des phases en leurs quatre constituants principaux. Il devait être suffisamment soluble dans l'eau saturée de sel pour s'y trouver en quantité appréciable, et devait correspondre à un composé relativement difficile à extraire. On a choisi l'isobutanol.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

La préparation des phases est faite dans des flacons jaugés de 100 ml à cols rodés et fermés à l'aide de bouchons en téflon. Dans ces flacons, on introduit successivement le sel, l'alcool, puis l'éther diéthylique, et on complète avec de l'eau distillée. Après agitation on porte au bain-marie maintenu à la température de 25°C ± 0,1°C (à moins qu'une autre température ne soit indiquée). On agite de temps à autre pour accélérer la dissolution du sel, ce qui exige environ 30 minutes, puis on laisse au repos pendant une nouvelle période de 30 minutes. Il doit toujours y avoir un très léger excès de sel, qui se traduit par la présence de quelques cristaux. Sur les phases séparées, on dose l'éther et l'éthanol (ou l'isopropanol) par chromatographie en phase gazeuse après dilution dans de l'eau et addition d'une quantité connue de propanol utilisé comme étalon interne.

Le chromatographe en phase gazeuse est le modèle Hy-Fi 600 de Aerograph, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne à remplissage de dix pieds (3,2 m). La phase liquide est du succinate de polyéthylène glycol. La température du four est maintenue à 50°C. Les résultats sont exprimés en volumes pour cent. Les teneurs en eau se déduisent du complément à cent.

Représentation graphique des résultats

Les systèmes quaternaires ne peuvent être étudiés que grâce à une représentation tétraédrique, mais les sels que nous avons utilisés sont très peu solubles dans les phases organiques (SINGLETON), et on a pu considérer l'eau saturée de sel comme un seul et même constituant en première approximation. Cela permet d'utiliser une représentation triangulaire d'un emploi plus simple. Dès lors, un point M (fig. 1) représente un mélange de « *a* » d'alcool, « *b* » d'éther diéthylique et « *c* » de solution saline. Les mélanges dont les points représentatifs sont situés dans une certaine partie du plan donnent naissance à deux phases, dont la composition est représentée par les points P_1 et P_2. Nous rappelons que le segment de droite P_1P_2, appelé droite de conjugaison ou conode, est le lieu des points représentatifs des divers mélanges donnant naissance à des phases de mêmes compositions. Ce qui varie quand on passe d'un point M à un point M′ appartenant à la même conode, ce sont les proportions respectives des phases P_1 et P_2, et on a la relation :

$$\frac{\text{masse de } P_1}{\text{masse de } P_2} = \frac{MP_2}{MP_1}.$$

Quant à la courbe reliant l'ensemble des points P_1 et P_2, nous rappelons qu'elle est dite courbe de démixtion et qu'elle sépare deux zones du triangle : une zone de miscibilité, qui correspond à des

mélanges ne formant qu'une phase, et une zone de démixtion, qui correspond à des mélanges donnant naissance à deux phases. En vue de vérifier la validité de la représentation triangulaire adoptée, on a préparé divers mélanges dont les points figuratifs étaient situés sur une même conode du système eau-éther diéthylique-éthanol-sulfate d'ammonium. On a ainsi vérifié qu'on aboutissait bien à la formation de phases de mêmes compositions.

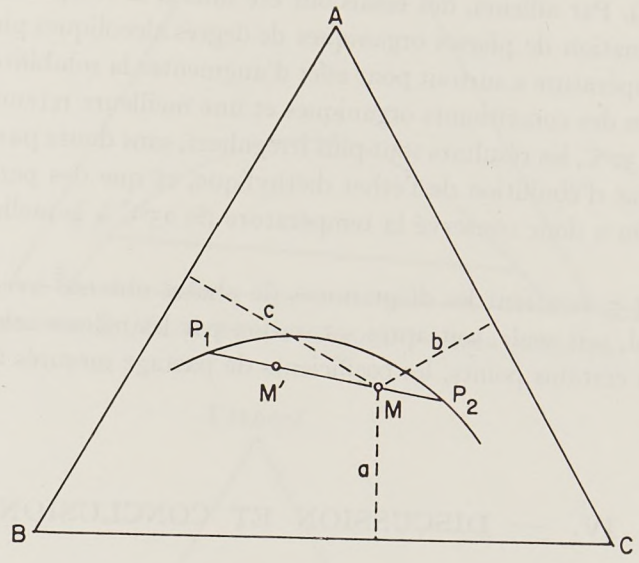


FIG. 1. — *Schéma explicatif du mode de représentation des résultats.*

Sur les figures, certaines conodes sont matérialisées. Les chiffres qui sont indiqués sont les résultats des mesures des coefficients de partage.

Mesure des coefficients de partage

Les mélanges ont été préparés dans des fioles de 100-110 ml possédant une graduation au dixième de ml entre ces deux valeurs. En choisissant convenablement les proportions d'éther diéthylique et d'alcool, on peut obtenir des phases organiques ayant un volume compris entre 5 et 10 ml. Ayant introduit une quantité connue d'isobutanol dans le flacon, il restait à mesurer, de façon aussi précise que possible, sa concentration dans la phase organique pour en déduire sa concentration dans la phase aqueuse. Ces mesures ont été faites par chromatographie en phase gazeuse en utilisant toujours le propanol comme étalon interne.

Toutes les mesures ont été faites après addition de 30 mg d'isobutanol. C'est, d'une part, une quantité suffisante pour qu'il en reste dans la phase aqueuse une teneur appréciable, et d'autre part une quantité assez faible pour que la concentration résiduelle dans la phase aqueuse soit inférieure à la solubilité de l'isobutanol en solution aqueuse saturée de sulfate d'ammonium. C'est pour cette dernière raison qu'il nous a été impossible de mesurer les coefficients de partage pour des composés moins solubles dans les phases aqueuses saturées de sulfate d'ammonium. Pour de tels composés, les isopentanols par exemple, la solubilité dans les solutions aqueuses saturées de sels est telle que la quantité restante dans la phase aqueuse est de l'ordre de grandeur des erreurs commises sur la mesure des quantités présentes dans les phases organiques. Il devient donc impossible d'évaluer les coefficients de partage.

III. — RÉSULTATS

Les figures 2, 3 et 4 montrent les diagrammes de phases obtenus avec les mélanges eau-éther diéthylique-éthanol, seuls ou saturés de chlorure de sodium ou de sulfate d'ammonium. La courbe de démixtion indiquée par la figure 2 est en accord avec les travaux dont les références sont citées par J. C. SMITH (1949) et dont les résultats sont indiqués par A. S. COOLIDGE (1928).

Par ailleurs, les points de la figure 4 situés sur le côté du triangle, et qui correspondent à des teneurs nulles en éther, sont bien ceux indiqués par SINGLETON. Le phosphate monosodique dont la dissolution est lente a finalement été éliminé. Sur ces figures sont indiquées quelques conodes, ainsi qu'en différents points les coefficients de partage mesurés pour l'isobutanol. La figure 4 indique en outre, selon une courbe tracée en pointillés, les résultats obtenus à 30°C (les coefficients de partage ont été obtenus à 25°C). Par ailleurs, des essais ont été faits à la température de la glace fondante et ont abouti à la formation de phases organiques de degrés alcooliques plus faibles qu'à 25°C. Une augmentation de la température a surtout pour effet d'augmenter la solubilité du sel, ce qui provoque une meilleure démixtion des constituants organiques et une meilleure retenue de l'eau dans la phase aqueuse. Cependant, à 30°C, les résultats sont plus irréguliers, sans doute parce que cette température est trop proche du point d'ébullition de l'éther diéthylique, et que des pertes en ce constituant deviennent inévitables. On a donc conservé la température de 25°C à laquelle les résultats sont plus reproductibles.

Les figures 5, 6 et 7 montrent les diagrammes de phases obtenus avec les mélanges eau-éther diéthylique-isopropanol, soit seuls, soit après saturation par les mêmes sels que précédemment. Ici aussi sont indiqués, en certains points, les coefficients de partage mesurés à 25°C pour l'isobutanol.

IV. — DISCUSSION ET CONCLUSION

Il ressort des différentes figures précédentes que le domaine de démixtion est d'autant plus grand que l'alcool est moins miscible à l'eau et que le sel a plus d'affinité pour l'eau. La richesse en alcool des phases organiques évolue dans le même sens, et ces phénomènes de démixtion apparaissent comme résultant d'une concurrence entre l'alcool et le sel dans leurs interactions avec l'eau. Le rôle de l'éther diéthylique apparaît différent, et serait surtout de faciliter la démixtion d'une phase organique par entraînement de l'alcool.

En ce qui concerne les coefficients de partage, il faut tout de suite remarquer qu'il existe sur certaines courbes de démixtion une conode réduite à un point, dit point critique (fig. 2, 3 et 5). En ce point les deux phases ont mêmes compositions, et le coefficient de partage pour une substance, quelle qu'elle soit, est forcément égal à 1. Ce point n'apparaît pas sur certaines courbes qui sont, en quelque sorte, incomplètes (fig. 3, 6 et 7). Bien que ce ne soit pas la raison de ce travail, il est intéressant d'indiquer qu'au voisinage de ce point les coefficients de partage sont proches de l'unité et peuvent être utilisés pour l'extraction à contre-courant dans des solutions saturées d'un sel.

Les résultats obtenus permettent de faire trois constatations.

1° Si on se place sur les conodes qui correspondent au côté du triangle pour lequel la teneur en alcool est nulle, c'est-à-dire dans le cas des mélanges eau-éther, on peut constater que l'addition de sel provoque une augmentation du coefficient de partage mesuré pour l'isobutanol. Cette augmentation est d'autant plus grande que le sel a plus d'affinité pour l'eau.

2° Si on se place sur les conodes qui correspondent au côté du triangle pour lequel la teneur en éther est nulle, c'est-à-dire dans les conditions proposées par SINGLETON, on peut constater que les coefficients de partage sont d'autant plus grands pour l'isobutanol que l'alcool qui sert de solvant est moins miscible à l'eau et que le sel a plus d'affinité pour elle. Quoi qu'il en soit, et contrairement à ce qui était attendu, ces coefficients de partage sont plus faibles que ceux obtenus avec l'éther diéthylique seul.

3° Entre ces deux cas extrêmes, il existe un maximum pour le coefficient de partage de l'isobutanol, lorsque l'isopropanol est utilisé comme solvant. Mais ce maximum reste du même ordre de grandeur que le coefficient de partage obtenu avec l'éther diéthylique seul.

L'addition d'un alcool comme tierce solvant ne favorise donc pas l'extraction des composés volatils en solution aqueuse saturée d'un sel.

Il semble cependant que cette technique d'extraction ait un intérêt, car elle permet de récupérer

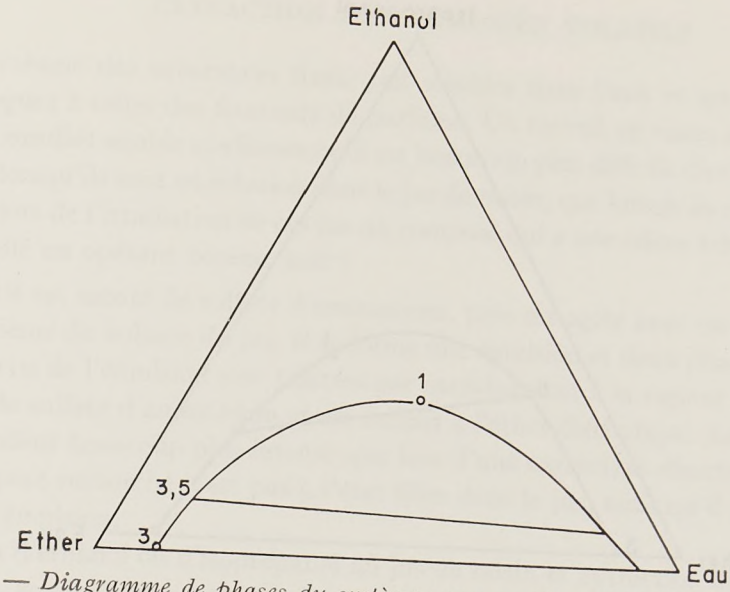


FIG. 2. — *Diagramme de phases du système : eau — éther diéthylique — éthanol.*

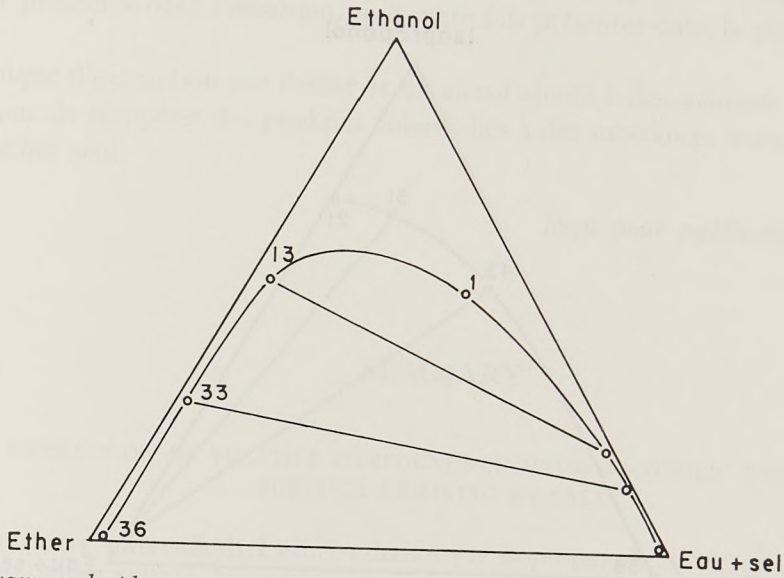


FIG. 3. — *Diagramme de phases du système : eau — éther diéthylique — éthanol — chlorure de sodium.*

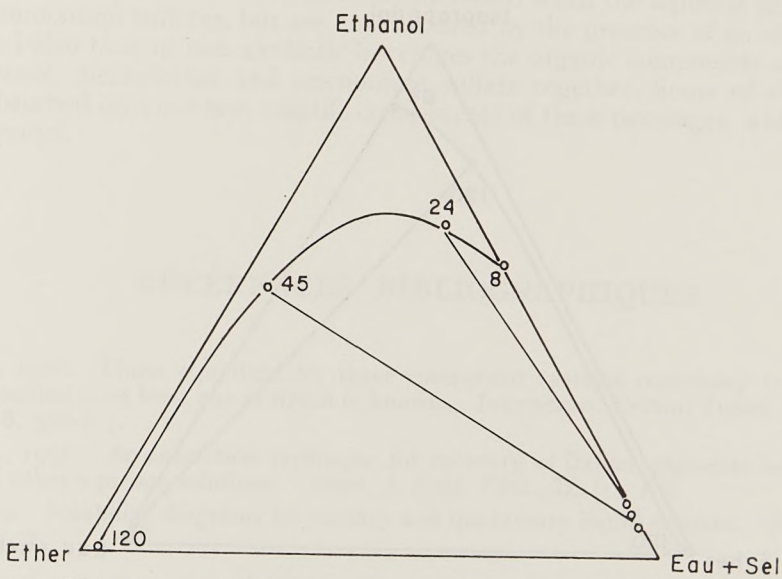


FIG. 4. — *Diagramme de phases du système : eau — éther diéthylique — éthanol — sulfate d'amonium.*

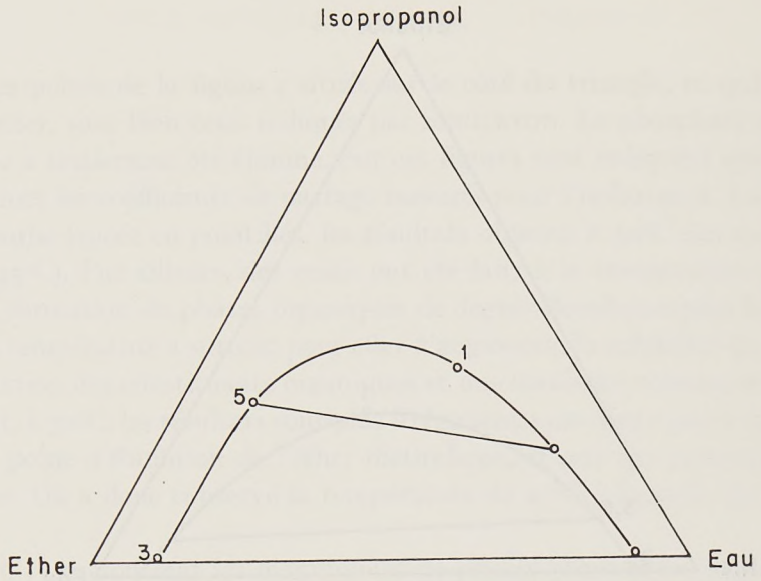


FIG. 5. — *Diagramme de phases du système : eau — éther diéthylique — isopropanol.*

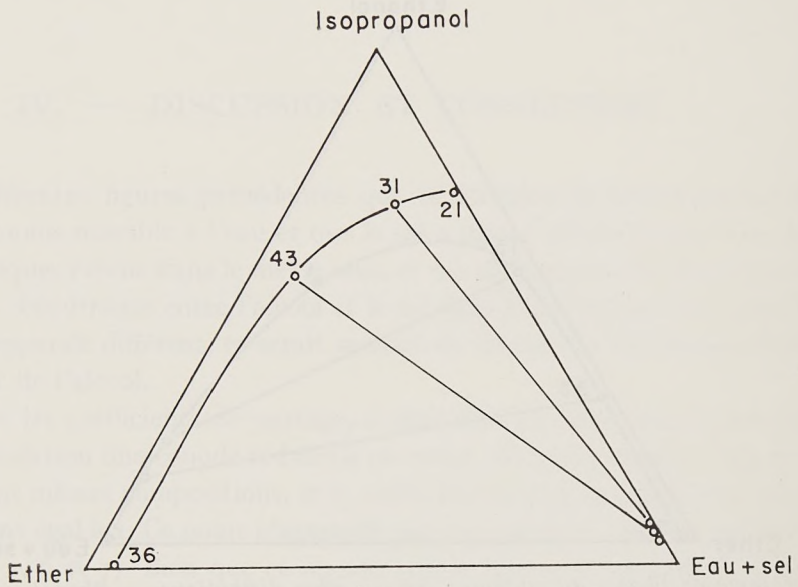


FIG. 6. — *Diagramme de phases du système : eau — éther diéthylique — isopropanol — chlorure de sodium.*

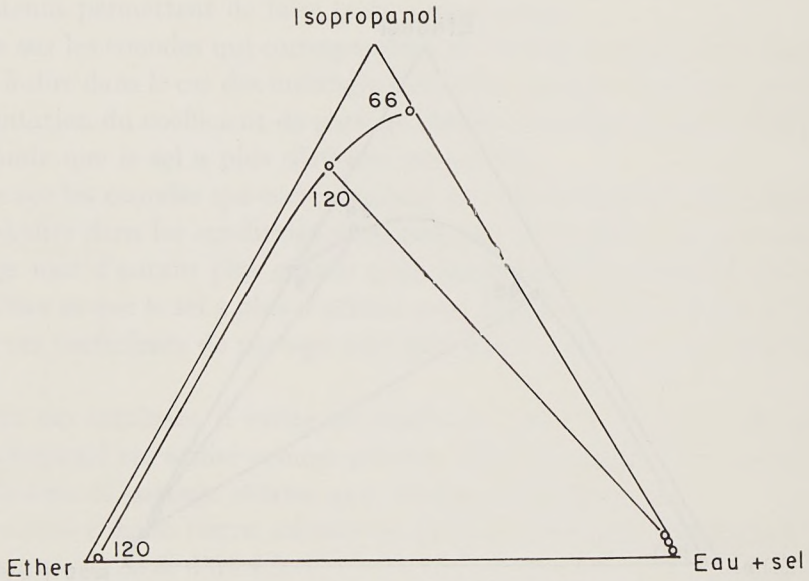


FIG. 7. — *Diagramme de phases du système : eau — éther diéthylique — isopropanol — sulfate d'amonium.*

sous un faible volume des substances fixes, peu solubles dans l'eau et qui ont probablement des propriétés analogues à celles des fixateurs de parfums. Un travail en cours sur les composés volatils des jus de raisin irradiés semble confirmer qu'il est beaucoup plus difficile d'extraire certains composés par l'éther seul, lorsqu'ils sont en solution dans le jus de raisin, que lorsqu'ils sont en solution aqueuse.

Il apparaît lors de l'irradiation de ces jus un composé qui a une odeur très forte et persistante et qui peut être isolé en opérant comme suit :

Le jus irradié est saturé de sulfate d'ammonium, puis est agité avec un volume d'éther diéthylique égal au dixième du volume du jus. Il se forme une émulsion et deux phases. La phase organique et la majeure partie de l'émulsion sont traitées par entraînement à la vapeur d'eau sous vide. Le distillat est saturé de sulfate d'ammonium et est extrait à l'éther diéthylique. Le solvant est évaporé et le résidu a une odeur beaucoup plus intense que lors d'une extraction directe sur le jus. On suppose donc que le composé recherché n'est pas à l'état libre dans le jus, mais qu'il est lié à des substances présentes dans l'émulsion.

Par addition d'éthanol ou d'isopropanol au jus de raisin et extraction dans les conditions envisagées plus haut, la phase organique traitée par entraînement à la vapeur d'eau permet d'obtenir le même résultat, ce qui laisse supposer que les substances auxquelles le composé recherché est lié, et qui étaient présentes dans l'émulsion, sont cette fois présentes dans la phase organique riche en alcool.

La technique d'extraction par l'éther et un alcool ajouté à des solutions naturelles saturées de sel permet donc de récupérer des produits volatils liés à des substances fixes, qui sont très mal extraites par l'éther seul.

Reçu pour publication en avril 1969.

SUMMARY

EXTRACTION OF VOLATILE COMPOUNDS IN HYDROALCOHOLIC SOLUTIONS THROUGH DEMIXING BY SALTS

Ternary systems water-diethyl ether-ethanol (or isopropanol), alone or saturated by sodium chloride or ammonium sulfate, have been studied in order to explain what happens during solvant extraction of flavors, and, if possible, to get better recoveries using the salting-out effect.

Partition coefficients have been measured for isobutanol in these systems. In the case of this volatile compound, the partition coefficients are increased when the aqueous phase is saturated by a salt (specialy ammonium sulfate), but are not favoured by the presence of an alcohol.

It appeared also that in non alcoholic beverages the organic compounds are well extracted by adding isopropanol, diethylether and ammonium sulfate together. Some of the flavor components seemed to be absorbed on some non volatile constituents of these beverages, which are not extracted without isopropanol.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

COOLIDGE A. S., 1928. Phase equilibria for three component systems containing two liquid phases, the complete composition of at least one of which is known. *Internation. Critical Tables*, New York, Mc Graw-Hill Book Co., **3**, 398-417.

SINGLETON V. L., 1961. An extraction technique for recovery of flavors, pigments and others constituents from wines and other aqueous solutions. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **12**, (1), 1-6.

SMITH J. C., 1949. Solubility diagrams for ternary and quaternary liquid systems. *Industr. engng. Chem.*, **41**, (12), 2932-2937.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (3), 249-261.

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

BIOSYNTHÈSE DES ALCOOLS SUPÉRIEURS DES BOISSONS FERMENTÉES

M. MOUTOUNET

Laboratoire de Technologie des Produits végétaux,
Station d'agronomie et d'Œnologie,
67, boulevard Deltour, 31 - Toulouse
Institut national de la Recherche agronomique

Les alcools supérieurs ne sont présents dans les moûts qu'à l'état de traces de l'ordre de 0,1 mg par kg de matière fraîche. Ils augmentent dans des proportions importantes au cours de la fermentation alcoolique. Les plus couramment rencontrés sont le méthyl-3 butanol 1 (alcool isoamylique), l'isobutanol, le méthyl-2 butanol 1 (alcool amylique actif) et le propanol ; on trouve également du butanol 1, du butanol 2, du pentanol 1, de l'hexanol 1 et 2, de l'octanol, du méthyl-3 butanol 2, du tyrosol, du phényl éthanol, du tryptophol et, plus exceptionnellement , du pentanol 2 et 3, du propanol 2, du nonanol 1 et 2, de l'heptanol 1 et 2, de l'undécanol et de l'hexène-2-ol 1.

L'ensemble de ces différents alcools, appelés alcools supérieurs ou huiles de fusel, sont concentrés dans la fraction de distillation passant après l'éthanol. Cette fraction elle-même est nommée huile de fusel.

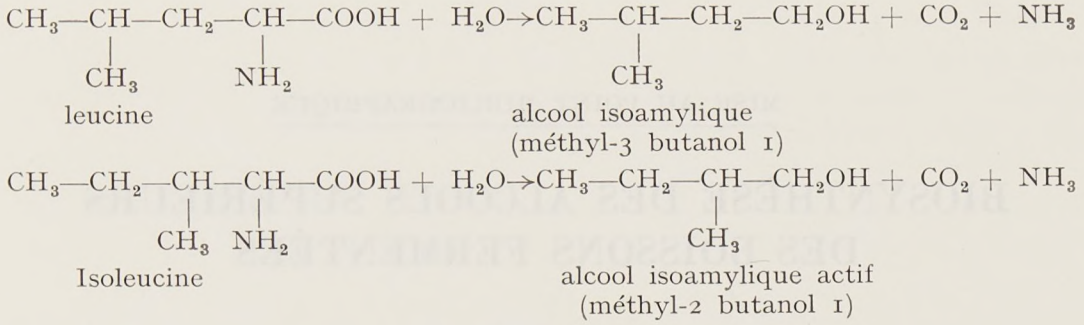
Les alcools supérieurs sont, quantitativement, parmi les composés volatils les mieux représentés dans les boissons fermentées. Les études plus ou moins récentes sur l'arôme des boissons fermentées ont souligné le rôle important que pourraient y jouer soit les alcools eux-mêmes, soit leurs esters. La connaissance de la biosynthèse des alcools de la fermentation alcoolique s'avère indispensable pour mener des essais rationnels sur le contrôle qualitatif de la fabrication des boissons fermentées.

Une excellente mise au point sur ce sujet a été publiée en 1963 par Webb et Ingraham. Le présent travail bibliographique, après un rappel des données essentielles, n'en est, en quelque sorte, que la mise à jour.

I. — BIOSYNTHÈSE A PARTIR DES ACIDES AMINÉS

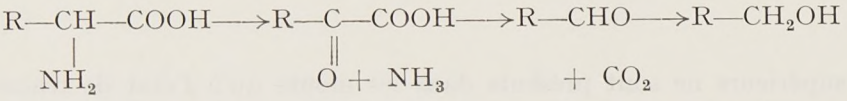
A la suite de l'identification des alcools isoamylique et amylique actif (Pasteur, 1855 ; Pedler, 1868 ; Kramer et Penner, 1870 ; Erlenmeyer, 1877), de l'isobutanol (Wurtz, 1852) et du propanol (Chancel, 1853) les premières recherches expérimentales pour expliquer leur genèse, au cours de la fermentation, furent entreprises par Ehrlich (1904, 1907).

Cet auteur établit une relation métabolique entre les acides aminés et les alcools supérieurs : l'addition de leucine et d'isoleucine à un milieu contenant du glucose comme sucre fermentescible conduit, après fermentation, à une augmentation d'huile de fusel. Pour Ehrlich, les acides aminés conduisent sous l'action d'un enzyme « hydratant » aux alcools supérieurs correspondants.



Ehrlich (1907-1912) montra aussi que les levures formaient du tyrosol et du trytophol si, respectivement, de la tyrosine et du tryptophane étaient ajoutés au milieu de fermentation.

Neubauer et Fromherz (1911) purent établir que les acides cétoniques étaient des intermédiaires dans le processus d'Ehrlich, en montrant que les acides cétoniques peuvent être produits à partir des acides aminés et que les acides cétoniques ajoutés peuvent être convertis en alcools ayant un atome de carbone de moins. Ils modifièrent le schéma d'Ehrlich comme suit :



L'essentiel de ce qui a été avancé par Ehrlich et par Neubauer et Fromherz a été confirmé par de nombreux auteurs (Yamada, 1932 ; Genevois, 1952 ; Ribéreau-Gayon et *al.*, 1955 ; Antoniani et *al.*, 1958 ; Yoshizawa et *al.*, 1961) et notamment Thorne (1937) qui montra que la valine donne de l'isobutanol selon le même processus.

Ensuite, en 1958, Senthe Shanmuganathan et Elsden apportèrent des connaissances nouvelles sur le mécanisme intime des étapes de la biosynthèse des alcools supérieurs. Ils étudièrent la formation du tyrosol. L'incubation de l'α-cétoglutarate et de la tyrosine avec un extrait de cellules de *Saccharomyces cerevisiae* donne du *p*-hydroxyphénylacétaldéhyde, de l'acide glutamique et du CO_2. Cette réaction est stimulée par le pyridoxal phosphate, coenzyme de transamination, et ce même extrait décarboxyle l'acide *p*-hydroxyphényl pyruvique en *p*-hydroxyphénylacétaldéhyde. Lorsque cet aldéhyde est ajouté à l'extrait de *Saccharomyces cerevisiae* contenant du NADH, il est réduit en tyrosol, tandis que le nicotinamide dinucléotide est oxydé (NAD). Senthe Shanmuganathan et Elsen en donnèrent le schéma suivant :

Tyrosine + cétoglutarate $\xrightarrow{\text{transaminase}}$ ac. glutamique + ac. *p*-hydroxyphénylpyruvique

ac. *p*-hydroxyphénylpyruvique $\xrightarrow{\text{carboxylase}}$ *p*-hydroxyphénylacétaldéhyde + CO_2

p-hydroxyphénylacétaldéhyde + NADH $\xrightarrow{\text{alcool-déhydrogénase}}$ tyrosol + NAD

De même, en présence de l'extrait de *Saccharomyces cerevisiae*, le transfert du groupement amino sur l'α-cétoglutarate a lieu avec la leucine, la norleucine, l'isoleucine, la valine, la norvaline, la méthionine, la phénylalanine et le tryptophane (Senthe Shanmuganathan, 1960).

En outre, cet auteur purifia la tyrosine transaminase et montra qu'elle était spécifique de l'acide cétoglutarique.

Il apparaît probable que le mécanisme détaillé de la formation du tyrosol à partir de la tyrosine avec l'intervention d'une transaminase, du pyridoxal-phosphate comme coenzyme, du cétoglutarate comme accepteur du groupement amine et du NADH comme agent réducteur, soit applicable aux alcools isobutylique et isoamylique.

II. — BIOSYNTHÈSE A PARTIR DU MÉTABOLISME DES SUCRES

Le mécanisme d'Ehrlich-Neubauer et Fromherz ne permet pas d'expliquer certains résultats expérimentaux.

Des quantités significatives d'alcools supérieurs (Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1959), de tyrosol (Stevens, 1960) et de phényléthanol (Äyräpää, 1963), sont formées au cours de la fermentation d'un milieu exempt d'acides aminés. Ehrlich, qui avait déjà remarqué ce fait, avait suggéré que l'autolyse des protéines de levure supplée à l'absence d'acides aminés exogènes.

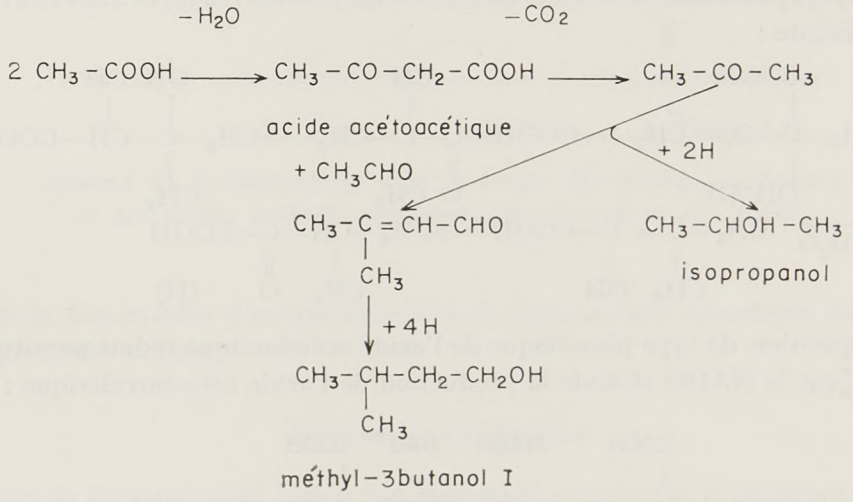
La teneur en alcools supérieurs trouvée après fermentation d'un milieu pauvre en acides aminés, tel que le moût de raisin, ne correspond pas à la composition initiale en acides aminés. Ribéreau-Gayon et Peynaud (1959) notent que la réaction d'Ehrlich ne rend compte que de la 1/10 partie, à peine, des alcools supérieurs formés au cours de la fermentation.

Pendant la fermentation, la disparition des acides aminés et la production des alcools supérieurs ne sont pas complémentaires (Castor et Guymon, 1952). Les acides aminés sont rapidement éliminés du milieu ; la formation des alcools supérieurs et de l'éthanol sont parallèles.

Certains alcools, comme le propanol et le butanol, n'ont pas de précurseurs directs dans les acides aminés des milieux naturels.

Quelques moûts de raisins sont même dépourvus d'isoleucine libre (Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1959).

Genevois et Lafon (1956) ont montré que de l'alcool isoamylique pouvait se former en absence de leucine. En faisant fermenter du saccharose en milieu synthétique à l'abri de l'air avec addition de traces d'acétate marqué sur le radical méthyl, ils constatèrent la présence de carbone marqué, dans les alcools isoamylique et isopropylique entre autres, et ont suggéré l'hypothèse suivante :



Peynaud et Guimberteau (1959) ont démontré qu'il s'effectue une production d'alcools supérieurs à partir d'autres acides aminés tels que le glycocolle, l'histidine, la sérine, la thréonine. Comme Antoniani *et al* (1948-1957), ils estiment que des phénomènes de transamination en faveur des leucines et de la valine interviendraient chez les levures.

Ces auteurs ont prouvé également qu'une partie des alcools supérieurs provient de la molécule de sucre ; ils constatèrent la production sensible d'alcools supérieurs après fermentation d'un milieu ne contenant que du saccharose et du sulfate d'ammonium. Toukis (1958) avait pensé auparavant que les alcools supérieurs pouvaient dériver du sucre. Il utilisait de la leucine et de l'isovaléraldéhyde marquées au carbone. L'isopentanol provenant de la leucine était moins radioactif que celui provenant de l'isovaléraldéhyde. Cet auteur proposait deux voies distinctes de biosynthèse, l'une à partir de la leucine, l'autre à partir des glucides avec l'isovaléraldéhyde comme précurseur commun.

Une voie nouvelle à partir du sucre était donc mise en évidence. Les étapes de cette voie ont été élucidées simultanément par deux groupes de chercheurs, et ceci grâce aux connaissances récemment acquises sur le métabolisme des acides aminés.

1. Yoshizawa *et al.* (1961) s'aperçurent que quelques acides aminés aliphatiques n'obéissent pas au schéma d'Ehrlich et Neubauer et donnent une augmentation d'alcools supérieurs ayant une chaîne carbonée de longueur correspondante.

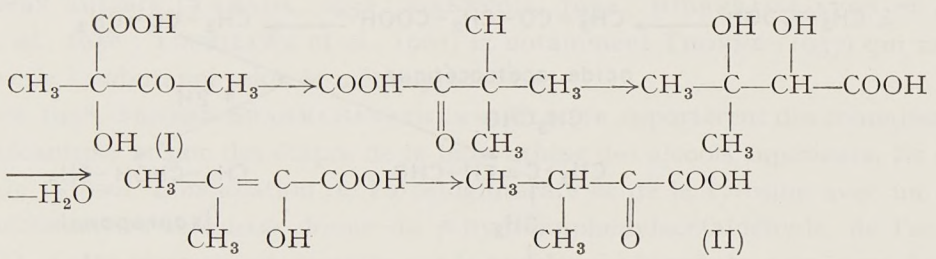
Il y a une augmentation d'isobutanol dans le cas d'addition d'alanine à un milieu de fermentation et de méthyl-2 butanol 1 dans le cas d'un apport d'acide α-aminobutyrique ou de thréonine.

Ces résultats ont suggéré une étroite relation entre la formation de ces alcools et la biosynthèse de la valine à partir de l'alanine et la biosynthèse de l'isoleucine à partir de l'acide aminobutyrique ou de la thréonine (Yoshizawa et Yamada, 1962).

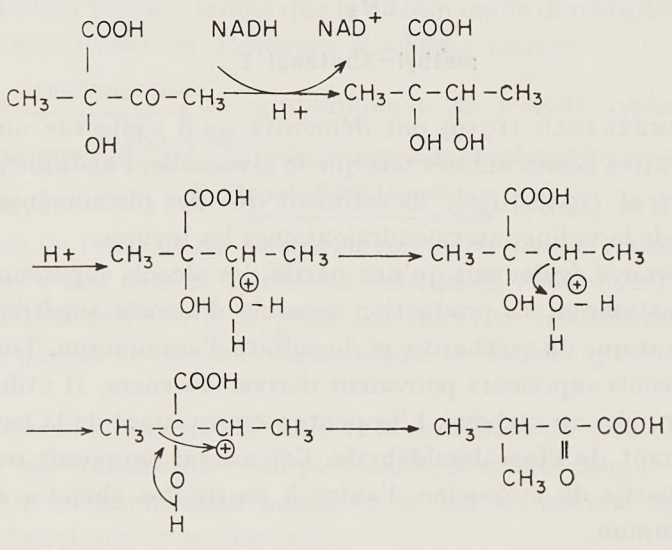
2. Ingraham et Guymon (1960) basent leurs travaux sur la constatation suivante : puisque *Saccharomyces cerevisae* a la possibilité de synthétiser tous les acides aminés, les alcools supérieurs qui ne sont pas fournis par des acides aminés exogènes doivent être synthétisés au moins au stade acides cétoniques par la même voie que celle de l'acide aminé correspondant.

Pour vérifier cette hypothèse, ils utilisèrent des mutants de *Saccharomyces* obtenus par irradiation U.V. Les mutants employés avaient perdu la faculté de synthèse vis-à-vis de la leucine, de l'isoleucine ou de la valine. Le fait que les levures qui ne sont pas capables de synthétiser la leucine, l'isoleucine ou la valine, ne produisent pas, respectivement, de méthyl-3, de méthyl-2 butanol 1 et d'isobutanol, indique que la synthèse des alcools supérieurs, à partir des sources d'hydrates de carbone, suit la même voie que celle des acides aminés correspondants.

La valine peut être synthétisée à partir du pyruvate. La première étape consiste en une condensation du pyruvate avec l'acétyl CoA pour donner l'acide acétolactique (I), intermédiaire mis en évidence par Strassmann *et al.* (1953) et Alderberg (1954). Le passage de l'acide α-céto-isovalérique (II) est justiciable de mécanismes différents ; Haris (1958) et Stevens (1960) indiquent la séquence suivante :

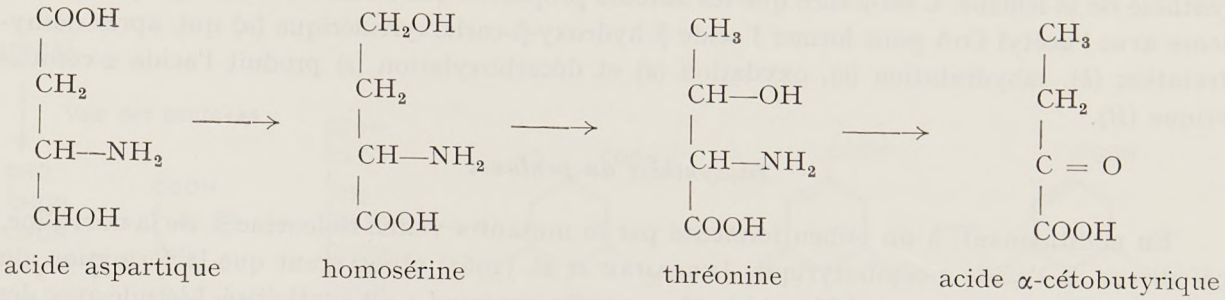


Une transposition de type pinacolique de l'acide acétolactique réduit paraîtrait plus logique et expliquerait que le NADH stimule la production de l'acide céto-isovalérique :



A partir de l'acide céto-isovalérique, une transamination conduit à la valine tandis que par le mécanisme d'EHRLICH-NEUBAUER et FROMHERZ, on aboutit à l'isobutanol.

L'acide α-céto-β-méthylvalérique, précurseur par transamination de l'isoleucine, est produit par le même mécanisme à partir de l'acide α-cétobutyrique. Ce céto-acide peut provenir, en passant par l'homosérine et la thréonine, de l'acide aspartique :



acide aspartique — homosérine — thréonine — acide α-cétobutyrique

La condensation de l'acide α-céto-isovalérique avec un molécule d'acétyl CoA donne l'acide α-céto-isocaproïque, précurseur de la leucine, par transamination, et du méthyl-3 butanol 1 par décarboxylation et réduction.

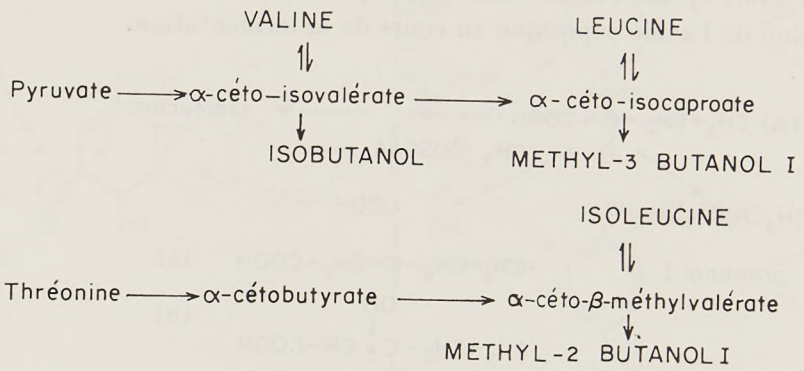


Schéma de la biosynthèse chez la levure des alcools supérieurs et des acides aminés correspondants (OUGH *et al.*, 1966)

L'étude de la biosynthèse d'autres alcools de la fermentation alcoolique fut entreprise par le même groupe de chercheurs.

Biosynthèse du propanol

Les travaux de GUYMON *et al.* (1961) ont apporté la preuve que le propanol 1 peut être synthétisé par la levure à partir de l'acide α-cétobutyrique ; l'addition d'acide α-aminobutyrique, source d'acide α-cétobutyrique pour la levure, stimule la production du propanol ainsi que du méthyl-2 butanol 1 (YOSHIZAWA et YAMADA, 1962) ; WILSON et ALDELBERG avaient montré, en 1957, que l'acide α-cétobutyrique est un intermédiaire de la biosynthèse de l'isoleucine. D'autre part, le métabolisme de l'acide α-cétobutyrique marqué sur le carbone 2 aboutit au propanol marqué en CI ; un mutant thréonine ne produit ni propanol ni méthyl-2 butanol 1.

Biosynthèse du butanol

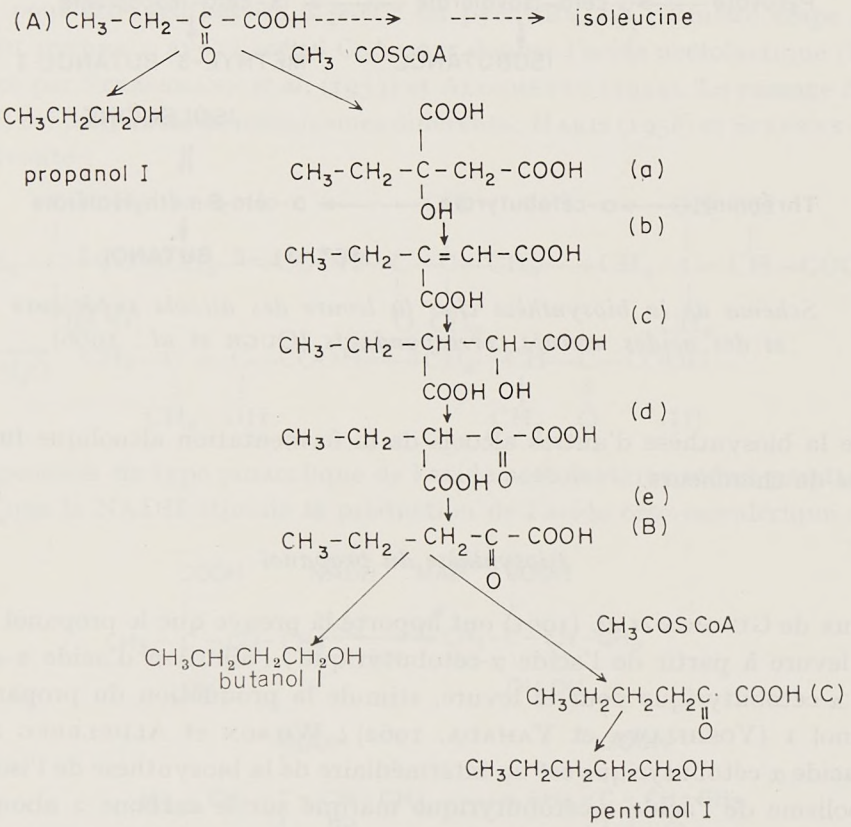
Un des mutants étudiés par INGRAHAM *et al.* (1961) exigeait à la fois l'isoleucine et la valine pour se développer. Puisque la leucine est synthétisée à partir de précurseurs immédiats de la valine, ce mutant est donc incapable de synthétiser les trois acides aminés : leucine, isoleucine,

et valine. En conséquence, ce mutant ne produit ni méthyl-2, ni méthyl-3 butanol, ni isobutanol, mais des quantités relativement élevées de propanol et de butanol. Les investigations au moyen de molécules marquées ont montré que le butanol est formé par la voie d'Ehrlich-Neubauer et Fromherz aux dépens de l'acide α-cétovalérique. L'acide α-cétobutyrique est à l'origine de ce dernier, de même que l'acide céto-isovalérique est à l'origine de l'acide α-cétoisocaproïque dans la synthèse de la leucine. C'est-à-dire que les auteurs proposent que l'acide α-cétobutyrique se condense avec l'acétyl CoA pour former l'acide β-hydroxy-β-carboxylvalérique (*a*) qui, après déshydratation (*b*), réhydratation (*c*), oxydation (*d*) et décarboxylation (*e*) produit l'acide α-cétovalérique (*B*).

Biosynthèse du pentanol

En additionnant, à un milieu fermenté par le mutant « valine-isoleucine », de la norvaline, précurseur de l'acide α-cétobutyrique, Ingraham *et al.* (1961) observèrent que la formation du butanol 1 est légèrement stimulée, et, de plus, que du pentanol 1 est synthétisé. L'étude avec des marqueurs indique que cet alcool est formé à partir de l'acide α-cétovalérique (*B*) par une voie semblable à celle de la formation du butanol 1 à partir de l'acide α-cétobutyrique, c'est-à-dire par l'intermédiaire de l'acide α-cétocaproïque (*C*).

L'hexanol I n'a pas été détecté, comme on aurait pu l'imaginer, après la fermentation du milieu auquel on avait ajouté l'acide aminé correspondant. Pour Webb (1967), l'hexanol serait formé par réduction de l'acide caproïque au cours de la fermentation.

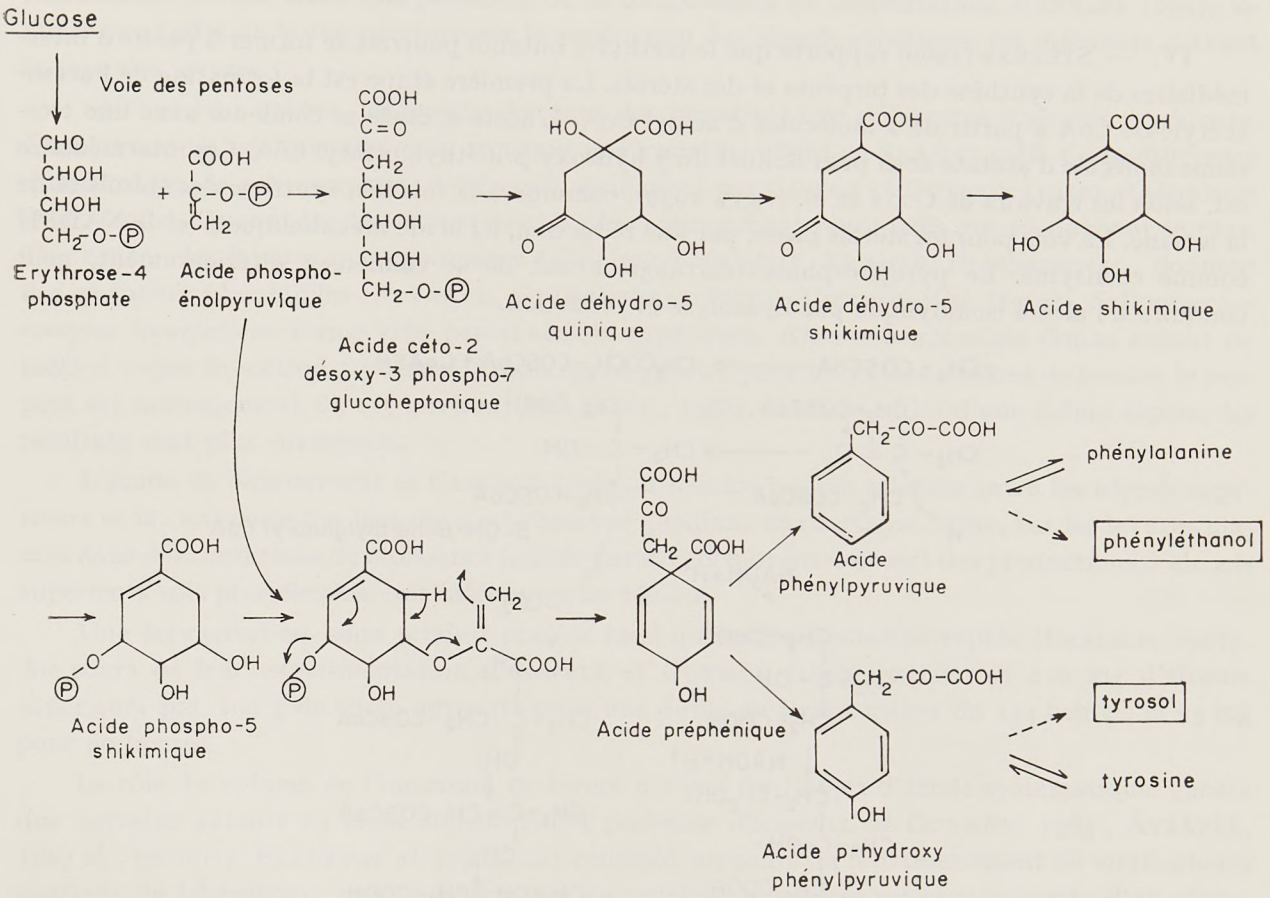


Biosynthèse du propanol, du butanol et du tyrosol

Biosynthèse du phényléthanol et du tyrosol

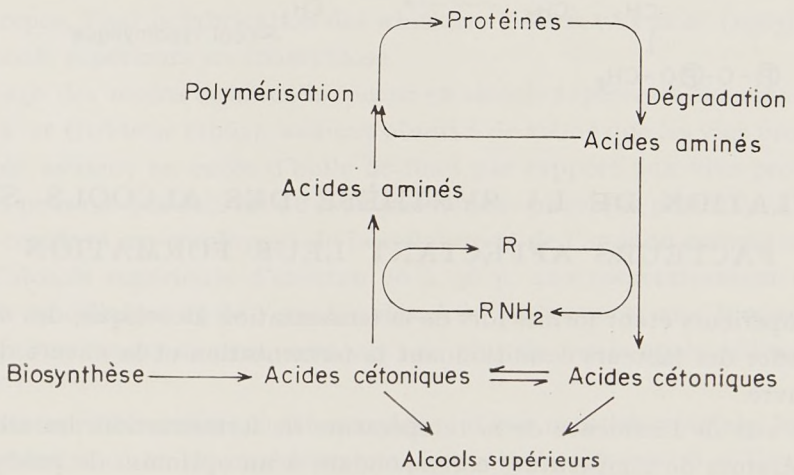
Äyräpää (1963-1965) a démontré que le phényléthanol est synthétisé par les levures, à la fois en présence et en absence de phénylalanine dans le milieu, et que la quantité formée est proportionnelle au sucre assimilé ; de même Stevens (1961) a pu doser de faibles quantités de phé-

nyléthanol après fermentation d'une solution synthétique dépourvue d'acides aminés. Ces résultats furent confirmés par Sapis (1967). Ce dernier suggère qu'une partie de ces alcools, de même que les alcools isoamylique et isobutylique, seraient formés directement à partir des sucres. *A priori*, on pourrait penser que le phényléthanol et le tyrosol sont formés, jusqu'au stade acides cétoniques, par la même voie que la phénylalanine et la tyrosine par la séquence de réactions suivante :



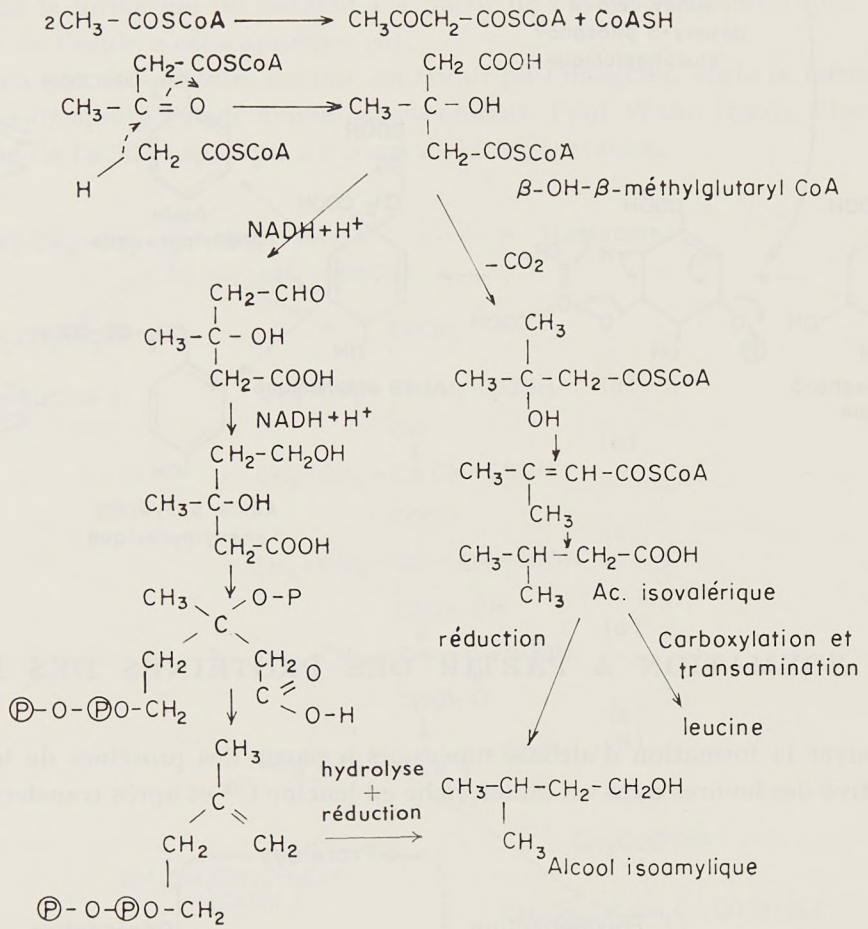
III. — FORMATION A PARTIR DES PROTÉINES DES LEVURES

Pour prouver la formation d'alcools supérieurs à partir des protéines de levure, Äyräpää (1967 *b*) a cultivé des levures dans un milieu riche en leucine C^{14} et après transfert dans un milieu



fortement limité en azote contenant seulement du glucose et du sulfate d'ammonium, il a obtenu à la fin de la fermentation du méthyl-3 butanol radioactif indiquant qu'environ 13 p. 100 de la leucine de la levure était transformée en cet alcool et qu'au moins 10 p. 100 de méthyl-3 butanol formé proviennent des protéines de la levure. Ces résultats suggèrent qu'au cours du catabolisme des protéines de levures les fonctions aminées des aminoacides sont réutilisées et que les acides cétoniques correspondants peuvent aboutir à la formation d'alcools supérieurs.

IV. — Stevens (1960) rapporte que le méthyl-3 butanol pourrait se former à partir d'intermédiaires de la synthèse des terpènes et des stérols. La première étape est la formation de l'acéto-acétyle de CoA à partir de 2 molécules d'acétyl CoA. L'acéto-acétate se condense avec une troisième molécule d'acétate actif pour donner du β-hydroxy-β-méthylglutaryl CoA. Cet intermédiaire est, selon les travaux de Coon et *al.* (1955, 1959), commun à la fois à la synthèse des stérols et de la leucine. La voie pour les stérols passe, par une réduction, à l'acide mévalonique avec le NADPH comme coenzyme. Le pyrophosphate réarrangé, avant de se condenser ultérieurement, peut conduire à l'alcool isoamylique par hydrolyse et réduction.



V. — RÉGULATION DE LA SYNTHÈSE DES ALCOOLS SUPÉRIEURS. FACTEURS AFFECTANT LEUR FORMATION

Les alcools supérieurs étant formés lors de la fermentation alcoolique, des recherches ont été entreprises sur l'effet des facteurs conditionnant la fermentation et la nature de la matière première mise en œuvre.

Au point de vue de l'influence de la température de fermentation, les auteurs s'accordent pour noter un optimum de température correspondant à un optimum de production des alcools

supérieurs. LINDET, dès 1888, trouvait moins d'alcools supérieurs à 8-10°C qu'à 25-27°C (10 p. 100). Des résultats similaires ont été obtenus par CASTOR (1954). Pour PEYNAUD et GUIMBERTEAU (1959), la formation des alcools isobutylique et isoamylique est influencée dans le même sens et le maximum se situe à 20°C. Pour OUGH *et al.* (1966), le maximum pour les isopentanols est atteint aux environs de 21-27°C. NORDSTROM (1965) rapporte un maximum de formation à 25°C. D'après les résultats publiés par OUGH *et al.* (1966), OUGH et AMERINE (1967), la formation de l'isobutanol semble assez indépendante de la température de fermentation. RANKINE (1967) signale que l'effet de la température sur la production des alcools supérieurs est différente suivant la race des levures.

Suivant leur nature, les levures forment des quantités très différentes d'alcools supérieurs. PEYNAUD et GUIMBERTEAU (1962) trouvent une variation allant de 83 à 353 mg/l. Cette différence quantitative, de 1 à 4 environ, a été notée également par CASTOR et GUYMON (1952) et GUYMON *et al.* (1961). Ce sont les *Saccharomyces* les plus couramment rencontrés qui en donnent le plus. Par contre, les levures non sporogènes telles que *Torulopsis, Kloekera, Brettanomyces...* donnent des quantités plus faibles (PEYNAUD, GUIMBERTEAU (1959), GUYMON *et al.* (1961)). *Schizosaccharomyces liquefaciens* forme très peu d'alcools supérieurs, *Kloeckera apiculata* donne autant de méthyl-2 que de méthyl-3 butanol, tandis qu'en général pour les autres souches de levures le rapport est normalement de 1/3 environ (BERTRAND, 1968). Dans le cadre d'une même espèce, les résultats sont plus divergents.

L'étude de NORDSTROM et CARLSON (1965) a montré qu'une relation entre les alcools supérieurs et la croissance des levures n'est observée que dans une certaine limite, car les levures placées dans des conditions de croissance limitée par divers moyens donnent des productions d'alcools supérieurs soit plus élevées, soit inférieures au témoin.

Une fermentation lente produit plus de fusel qu'une fermentation rapide (EHRLICH, 1907). Au cours de leur expérimentation, CROWELL et GUYMON (1963) obtiennent 120 mg d'alcools supérieurs par 100 g de sucre fermenté pour une durée de fermentation de 144 heures, et 95 mg pour 96 heures.

Le rôle du volume de l'inoculum de levure n'a pas été l'objet d'étude systématique, encore que certains auteurs en aient signalé l'effet probable (CROWELL et GUYMON, 1963 ; ÄYRÄPÄÄ, 1967 *a*) ; en outre, FLANZY *et al.* (1968) ont constaté, au cours du fonctionnement de vinificateurs continus de laboratoire, que la diminution du nombre de levures est concomitante d'un abaissement de la formation d'alcools supérieurs.

PEYNAUD et GUIMBERTEAU (1962) ont recherché quelle était l'influence de l'aération sur la formation des alcools supérieurs en menant deux séries parallèles d'essais, les uns fermentant en flacons obturés d'un tube effilé, les autres flacons obturés d'un tampon d'ouate. A de rares exceptions près, la quantité formée est plus élevée dans les fermentations se poursuivant à l'abri de l'air. Cependant GUYMON *et al.* (1961), GROWELL (1963), ont obtenu environ cinq fois plus d'alcools supérieurs en utilisant une agitation continue tout au long de la fermentation, par rapport aux essais laissés au repos. Pour la fabrication des whiskies, YOSHIZAWA *et al.* (1963) notent une teneur plus élevée d'alcools supérieurs en anaérobiose.

Le débourbage des moûts diminue la teneur en alcools supérieurs des vins blancs. BERTRAND (1968), GROWELL et GUYMON (1963), avaient observé de même que les vins produits à partir d'un moût très trouble avaient un excès d'huile de fusel par rapport aux vins provenant d'un moût clair. Ces auteurs pensent que ceci est dû à un phénomène physique plutôt qu'à un effet chimique. En effet, ils ont constaté, en employant de la cellulose et de l'amidon comme support inerte, une augmentation d'alcools supérieurs d'environ 26 à 36 p. 100 respectivement et seulement 9 et 18 p. 100 avec de la cellulose et de l'amidon désaérés, par rapport aux témoins. D'ailleurs DIETRICH et KLAMMERTH (1941) avaient noté 2,5 fois plus de fusels après adjonction au moût de charbon animal.

Le rôle des facteurs de croissance est complexe ; d'une manière générale, les carences laissent apparaître une quantité d'alcools supérieurs plus importante (PEYNAUD et GUIMBERTEAU, 1962).

Willforth et Schmid (1954) ont observé que, dans les moûts de raisin et de pomme, les alcools supérieurs augmentent avec l'importance du sucrage et que la teneur en alcools supérieurs s'élève proportionnellement à la formation totale d'éthanol ; des résultats semblables ont été obtenus par Peynaud et Guimberteau (1959) dans un milieu ne contenant de l'azote que sous forme ammoniacale.

Peynaud et Guimberteau (1962) ont constaté que des conditions différentes d'acidité influent nettement sur la formation des alcools isoamylique et isobutylique. A pH 2,6, la formation est minimale, elle augmente jusqu'à 4,5 lorsque le pH s'accroît puis diminue à pH 5,0. La formation est deux fois plus abondante à pH 4,5 qu'à pH 2,6. La teneur en alcools supérieurs est plus faible pour des vins provenant de moût dont le pH est inférieur à 3,0. Les résultats obtenus par Rankine (1967) révèlent qu'une augmentation du pH de 3,0 à 4,2 entraîne une production plus élevée de 11 p. 100 pour le propanol, de 85 p. 100 pour l'isobutanol et de 28 p. 100 pour les isopentanols. Yoshizawa et Yamada ont observé sur des milieux synthétiques qu'une plus grande quantité de méthyl-2 butanol 1 est formé à pH 5,2 qu'à pH 4,6.

La formation des alcools supérieurs suivant la nature de la source azotée a été étudiée par Peynaud et Guimberteau (1959), (1962). Vingt-deux acides aminés ont été employés comme source d'azote d'un milieu au saccharose contenant tous les autres éléments et facteurs de croissance aux doses optimales. Ils ont été classés en trois catégories :

1. Ceux qui produisent des quantités d'isobutanol et isopentanols de l'ordre de 50 mg/l ; ce sont : les sels ammoniacaux, l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la glutamine, l'ornithine, le tryptophane, la tyrosine.

2. Les acides aminés (autres que la leucine, l'isoleucine, la valine) donnant des quantités plus importantes de l'ordre de 150-200 mg/l ; ce sont : la cystéine, le glycocolle, l'histidine, la méthionine, la proline, la sérine et la thréonine.

3. Les acides aminés qui peuvent donner directement l'isobutanol et le méthyl-2 et le méthyl-3 butanol par le mécanisme d'Ehrlich. Avec ces acides aminés les quantités d'alcools formées sont toujours, dans les conditions des essais, entre 300-400 mg/l. Une fraction seulement de leucine, d'isoleucine et de valine est utilisée par les levures.

Dans le cas d'un moût fortement enrichi en ammoniaque (+ 196 mg/l) la formation des alcools supérieurs est inférieure à celle du moût témoin ; l'ordre de grandeur de cette diminution est de 30 p. 100 environ pour chacun des deux alcools dans l'exemple cité. Cet effet inhibant de l'ammoniaque avait été constaté par Ehrlich (1907) et a été confirmé par la suite (Yoshizawa, 1966 ; Äyräpää, 1967). Le rôle de l'acide aspartique est identique (Ehrlich, 1907).

Yoshizawa (1966) remarque que la teneur en alcools supérieurs et la valeur du rapport isopentanols sur isobutanol sont plus faibles pour les boissons alcooliques fabriquées à partir de grains que pour celles faites à partir des fruits. Ces remarques ne restent valables que pour différencier les *Scotch whishies* des eaux-de-vie de vins (Singer, 1965-1966 ; Jouret et Moutounet, 1968). Elles diffèrent pour les whiskies à base de maïs, blé, orge, seigle (De Becze, *et al.* 1967 ; Schoeneman et Dyer 1968) ainsi que pour les calvados et les eaux-de-vie de fruits à noyaux (Deluzarche *et al.*, 1967). Le moût provenant de l'orge renferme une quantité d'acides aminés relativement plus importante que celle du moût de raisin. Le pH du premier est plus élevé que celui du second. Au cours de ses expériences avec des milieux synthétiques, l'influence de ces deux facteurs a été envisagée par Yoshizawa (1966). Il conclut que la teneur en acides aminés et en ammonium sont les facteurs les plus importants qui affectent la composition en alcools supérieurs.

Äyräpää (1967 *a*) précise mieux le rôle de la nutrition azotée. Différents milieux, contenant comme source d'azote un mélange complexe d'acides aminés analogue à la composition de la levure, sont fermentés par des levures de bière. A des doses variées du mélange sont ajoutées des quantités croissantes de leucine, d'isoleucine ou de valine marquées. La radioactivité est recherchée, après fermentation, dans les acides aminés du milieu et de la levure, ainsi que dans les alcools supérieurs. Äyräpää (1967 *a*) établit dans ces conditions expérimentales que les voies de biosynthèse (mécanisme d'Ehrlich — biosynthèse à partir des sucres) pour l'isobutanol, le méthyl-2,

le méthyl-3 butanol et le phényléthanol, dépendent d'une manière caractéristique de la quantité et de la composition de la source azotée ; l'influence est similaire pour les quatre alcools étudiés cependant que les paramètres sont différents. ÄYRÄPÄÄ donne un schéma commun, idéalisé, montrant l'influence de la nutrition azotée sur la formation des alcools supérieurs.

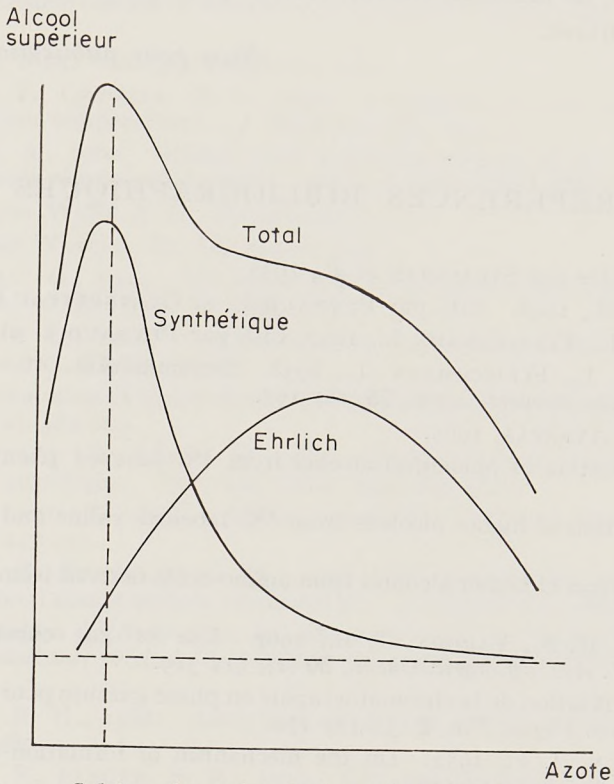


FIG. 1. — *Schéma des voies de formation des alcools supérieurs en fonction de la teneur d'un mélange d'acides aminés (*ÄRPÄYÄÄ. *1967)*

YOSHIZAWA (1966) considère que, dans un milieu pauvre en acides aminés, les levures doivent synthétiser les acides aminés demandés pour leur croissance à partir du glucose ; s'il y a des quantités insuffisantes de résidus aminés ou d'ammonium pour l'amination des céto-acides, les acides cétoniques accumulés subissent une décarboxylation en aldéhydes et donnent par réduction les alcools supérieurs correspondant ; par contre, l'existence de quantités suffisantes de résidus aminés et d'ammonium dans le milieu augmente la formation des acides aminés et diminue la formation des alcools supérieurs. La composition des alcools supérieurs dépendrait donc de l'aptitude de la race de levure à la synthèse des acides aminés. HOUGH et STEVENS (1961) partagent ce point de vue.

Il est de l'avis de nombreux auteurs, comme l'avait suggéré EHRLICH, que la production d'alcools supérieurs est la conséquence de l'utilisation par la levure des acides aminés correspondants comme source d'azote. Ces acides aminés seraient donc pour la levure des donneurs préférentiels du groupement aminé.

En ce qui concerne la voie à partir d'hydrates de carbone, on pourrait envisager que les alcools supérieurs sont les résultats de l'activité particulière de décarboxylases spécifiques d'acides cétoniques intermédiaires de la biosynthèse de la valine, leucine, isoleucine, car il n'est pas signalé d'autres alcools correspondants aux autres acides aminés des milieux naturels.

La biosynthèse des alcools supérieurs est donc étroitement liée au métabolisme des acides aminés par la levure.

Avec ÄYRÄPÄÄ (1967 *a*), on peut résumer ainsi ce qui a été clairement établi : les alcools des boissons fermentées peuvent provenir, soit cataboliquement des acides aminés du milieu par la séquence de réaction nommée « mécanisme d'EHRLICH-NEUBAUER et FROMHERZ », soit anabo-

liquement à partir de la principale source de carbone par la même voie que la synthèse des acides aminés, les acides cétoniques étant la clef intermédiaire entre l'acide aminé et l'alcool correspondant.

La composition et la quantité des alcools supérieurs formés sont sous l'influence des conditions imposées de fermentation, de la nature du substrat, et principalement de la composition et de la teneur en acides aminés libres.

Reçu pour publication en janvier 1969.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALDERBERG A., 1954. Citée par STRASSMAN et *al.*, 1958.

ANTONIANI C., CIOFFI R. M., 1948. Cité par PEYNAUD E. et GUIMBERTEAU G.

ANTONIANI C., FEDERICO L., FLEISCHMANN L., 1957. Cité par PEYNAUD E. et GUIMBERTEAU G.

ANTONIANI C., FEDERICO L., FLEISCHMANN L., 1958. Desamination et fermentation alcoolique des amino-acides. *Industr. aliment. agric.*, **75**, 187-197.

ÄYRÄPÄÄ, 1963. Cité par ÄYRÄPÄÄ, 1965.

ÄYRÄPÄÄ, 1965. The formation of phenethyl alcohol from ^{14}C labelled phenylanine. *J. Inst. Brew.*, **71** (4), 341-347.

ÄYRÄPÄÄ, 1967 *a*. Formation of higher alcohols from ^{14}C labelled valine and leucine. *J. Inst Brew.*, **73** (1), 17-30.

ÄYRÄPÄÄ, 1967 *b*. Formation of higher alcohols from amino-acids derived from yeasts proteins. *J. Inst. Brew.*, **73** (1), 30-33.

BECZE (de) G. I., SMITH H. F., VAUGHN T. E., 1967. Use of gas chromatography in distillery research and control. *J. Ass. off. agric. Chem.*, **50** (2), 311-319.

BERTRAND A., 1968. Utilisation de la chromatographie en phase gazeuse pour le dosage des constituants volatils du vin. *Connaiss. Vigne, Vin*, **2** (3), 175-270.

CASTOR D. G. B., GUYMON J. F., 1952. On the mechanism of formation of higher alcohols during alcoholic fermentation. *Science*, 155-147.

CASTOR D. G. B., 1954. Cité par WEBB A. D., INGRAHAM J. L.

CHANCEL G., 1853. Cité par WEBB A. D., INGRAHAM J. L.

COON *et al.*, 1955, 1959. Cité par STEVENS, R., 1960.

CROWELL E. A., GUYMON D. F., 1963. Influence of aeration and suspended material on higher alcohols, acetoïne and diacetyl, during fermentation. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **14**, 214-222.

DELUZARCHE A., MAILLARD A., MAIRE J. C., SOMMER J. M., WAGNER M., 1967. Analyse de quelques eaux-de-vie par chromatographie en phase vapeur, *Ann. Falsif. Fraudes*, (**676**), 173-181.

DIETRICH H. R., KLAMMERTH, 1941. Über die Bildung des fuselöls im verlauf der alkoholischen Gärung. *Z. Spiritusind.* **64**, 160.

EHRLICH F., 1904-1912. Cité par WEBB A. D., INGRAHAM J. L.

ERLENMEYER E., HELL C., 1871. Cité par WEBB A. D., INGRAHAM J. L.

FLANZY M., POUX C., DUBOIS P., DUPUY P., 1968. Fermentation du moût de raisin en continu. Formation des alcools supérieurs. *Ann. Technol. agric.*, **17** (3), 207-215.

GENEVOIS L., 1952. Formation des alcools supérieurs et de leurs dérivés au cours de la fermentation alcoolique. *Industr. aliment. agric.*, **69**, 27.

GENEVOIS L., LAFON M., 1956. Transformation de l'acétate marqué par la levure en fermentation anaérobie : formation d'acide succinique, d'isopropanol, d'alcool amylique et de stérols. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **38**, 89-97.

GUYMON D. F., INGRAHAM D. L., CROWELL E. A., 1961. The formation of propanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 163-168.

HARRIS G., 1958. *The chemistry and biology of yeasts* (COOK A. H.) chapt IX. Academic Press. New York.

HOUGH D. S., STEVENS R., 1961. Beer Flavor. IV Factors affecting the production of fusel oil. *J. Inst. Brew.*, **67**, 488-494.

INGRAHAM J. L., GUYMON J. F., 1960. The formation of higher aliphatic alcohols by mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**, 157-166.

INGRAHAM D. L., GUYMON D. F., CROWELL E. A., 1961. The pathway of formation of butyl and namyl alcohols by a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 169-175.

JOURET C., MOUTOUNET M. 1968. Comparaison des alcools supérieurs des eaux-de-vie d'Armagnac et des whiskies. *Ann. Technol. agric.*, **17** (2), 151-152.

KRAMER G., PENNER A., 1870. Cité par WEBB A. D., INGRAHAM J. L.

KEPNER R. E., CASTOR G. B., WEBB A. D., 1954. Cité par WEBB A. D., INGRAHAM J. L.

LINDET L., 1888. Cité par WEBB A. D., INGRAHAM J. D.

MILLER B. S., JOHNSON D. A., ROBINSON R. O., 1961. Identification of carbonyl compounds produced in pre-ferments. *Cereal. Chem.*, **38**, 507-515.

NEUBAUER O., FROMHERZ K., 1911. Cité par WEBB A. D., INGRAHAM J. L.

NORDSTROM K., 1965. Possible control of volatile ester formation in brewing. *Proc.europ. Brew. Conv.* 195-207.

NORDSTROM K., CARLSON, 1965. Cité par ÄYRÄPÄÄ, 1967.

OUGH C. S., GUYMON D. F., CROWELL E. A., 1966. Formation of higher alcohols during grape juice fermentation at various temperatures. *J. Food Sci.*, **31**, 620-625.

OUGH C. S., AMERINE M. A., 1967. Studies with controled fermentation. X. Effect of fermentation temperature on some volatils compounds in wine. *Amer J. Enol. Vitic.*, **18** (3), 157.

PASTEUR L., 1855. Cité par WEBB A. D., INGRAHAM J. L.

PEDLER A., 1868. Cité par WEBB A. D., INGRAHAM J. L.

PEYNAUD E., GUIMBERTEAU G., 1959. Mécanismes de la formation des alcools supérieurs au cours de la fermentation alcoolique. *C. R. Acad. Sci.*, **248**, 868.

PEYNAUD E., GUIMBERTEAU G., 1962. Sur la formation des alcools supérieurs par les levures de vinification. *Ann. Technol. agric.*, **11** (2), 85-105.

RANKINE B. C., 1967. Formation of higher alcohols by wine yeasts and relationship to taste thresholds. *J. Sci. Food Agric.*, **18** (12), 583-589.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., LAFON M., 1955. Recherches sur la genèse des produits secondaires de la fermentation alcoolique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **37**, 457.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1959. Acides aminés des moûts et alcools supérieurs des vins. *84e Congr. Soc. Savantes*, 247-251.

RONKAINEN P., BRUMMER S., SUAMALAINEN H., 1967. Chromatographic identification of carbonyl compounds. IX. The carbonyl compounds in crude spirits. *J. Chromatogr.*, **28** (2), 270-276.

SAPIS J. C., 1967. *Contribution à l'étude dans les vins du tyrosol, du tryptophane, de l'alcool phényléthylique et de la γ butyrolactone, produits secondaires de la fermentation alcoolique.* Thèse doctorat 3e cycle Bordeaux.

SCHONEMAN R. L., DYER R. H., 1968. Analytical profile of cistern room whiskies. *J. Ass. off. agric. Chem.*, **51** (5), 973-987.

SENTHE SHANMUGANATHAN S., ELSDEN S. R., 1958. Cité par WEBB A. B., INGRAHAM J. L.

SENTHE SHANMUGANATHAN S., 1960. Cité par WEBB A. B., INGRAHAM J. L.

SINGER D. D., 1966. The analysis and composition of potable spirits : determination of C_3, C_4, and C_5 alcohols in whisky and brandy by direct gas chromatography. *Analyst*, **91**, 127-134.

SINGER D. D., 1966. The proportion of 2-methyl butanol and 3 methyl-butanol in some brandies and whiskies as determined by direct gas chromatography. *Analyst*, **91**, 790-794.

STEVENS R., 1960. Beer flavor. I. Volatile products of fermentation : A review. *J. Inst. Brew.*, **66** (6), 453-471.

STEVENS R., 1961. Cité par SAPIS.

STRASSMAN M., THOMAS A. D., WENHOUSSE S., 1953. Cité par STRASSMAN *et al.*, 1958. Enzyme studies on the biosynthesis of valine of yeast. *J. amer. chem. Soc.*, **80**, 1771-1772.

THORNE R. S.W. 1937. Cité par WEBB A. D., INGRAHAM J. L.

TOUKIS G., 1968. The mecanism of isoamyl alcohol formation using tracer techniques. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **9** (4), 161.

WEBB A. D., 1967. Wine flavor : volatile aroma compounds of wines ; in *Chemistry and physiology of flavors*, SCHULTS, DAY and LIBBEY.

WEBB A. D., INGRAHAM J. L., 1963. Fusel oil. *Adv. appl. Microbiol.*, **5**, 317.

WILLFORTH F., SCHMID W., 1954. Uber hohere Alkoholeim. Wein. *Wein-Wissenchaft*, **8**.

WILLSON L. D., ALDELBERG E. A., 1957. Cité par WEBB A. D., INGRAHAM J. L.

WURTZ A., 1852. Cité par WEBB A. D., INGRAHAM J. L.

YAMADA M., 1932. Cité par YOSHIZAWA et YAMADA.

YAMAMOTO A., 1961. Flavors of sake. III. Separation and identification of ketocarboxylic acids. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **35**, 711-715.

YOSHIZAWA K., FURUKAWA T., TADENUMA M., YAMADA M., 1961. The formation of higher alcohols in the fermentation of amino-acids by yeast : the determination of alcohols with gas chromatography. *Agric. biol. Chem.*, **25** (4), 326-332.

YOSHIZAWA K., YAMADA M., 1962. The formation of higher alcohols on the fermentation of amino-acids by yeast : the formation of higher alcohols from amino butyric acid by washed yeast cells. *Agric. biol. Chem.*, **26** (8), 494-499.

YOSHIZAWA K., *et al.*, 1963. Cité par YOSHIZAWA 1966.

YOSHIZAWA K., 1966. On various factors affecting formation of isobutanol and isoamyl alcohols during alcohols fermentation. *Agric. biol. Chem.*, **30** (7), 634-641.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (3), 263-272.

MISE AU POINT

LES ACIDES ORGANIQUES DU VIN

J. CARLES

Laboratoire de Physiologie végétale de l'Institut catholique, 31 - Toulouse

De tous les éléments qui constituent le vin, les plus caractéristiques sont les acides organiques. Puisqu'ils s'accumulent, on doit évidemment supposer qu'ils ne sont pas très intéressants pour le métabolisme, car s'ils l'étaient ils seraient immédiatement utilisés et leur temps de vie rendrait impossible leur augmentation. C'est donc les rebuts du métabolisme que représentent les plus abondants des acides organiques du vin, parmi lesquels se trouvent aussi des restes peu stables d'acides intéressants.

Le nombre des acides organiques que l'on peut trouver dans le vin est assez élevé et dépasse la cinquantaine ; une bonne vingtaine sont assez ordinaires et une douzaine sont dosables.

Principaux acides organiques du vin

Acide tartrique	25 à 65	méq. par litre
— lactique	10 à 135	— —
— succinique	8 à 17	— —
— citramalique	7 à 15	— —
— diméthylglycérique	5 à 10	— —
— galacturonique	3 à 5	— —
— acétique	3 à 8	— —
— malique	traces à 150	— —
— citrique	— à 8	— —
— cétoglutarique	— à 1	— —
— pyruvique	— à 1	— —
— formique	— à 2	— —
— propionique	—	
— butyrique	—	
— gluconique	parfois présent	
— glycérique	—	—
— mucique	—	—
— shikimique	—	—
— quinique	—	—
— glycolique	—	—
— glyoxylique	—	—

Tous ces acides sont évidemment le fruit du métabolisme, soit de la plante, soit des levures qui ont transformé le moût en vin.

Trois principaux cycles interviennent au cours de ce métabolisme ; le cycle des cétoses qui enrichit la vigne en glucides au cours de la photosynthèse, le cycle citrique qui permet d'utiliser

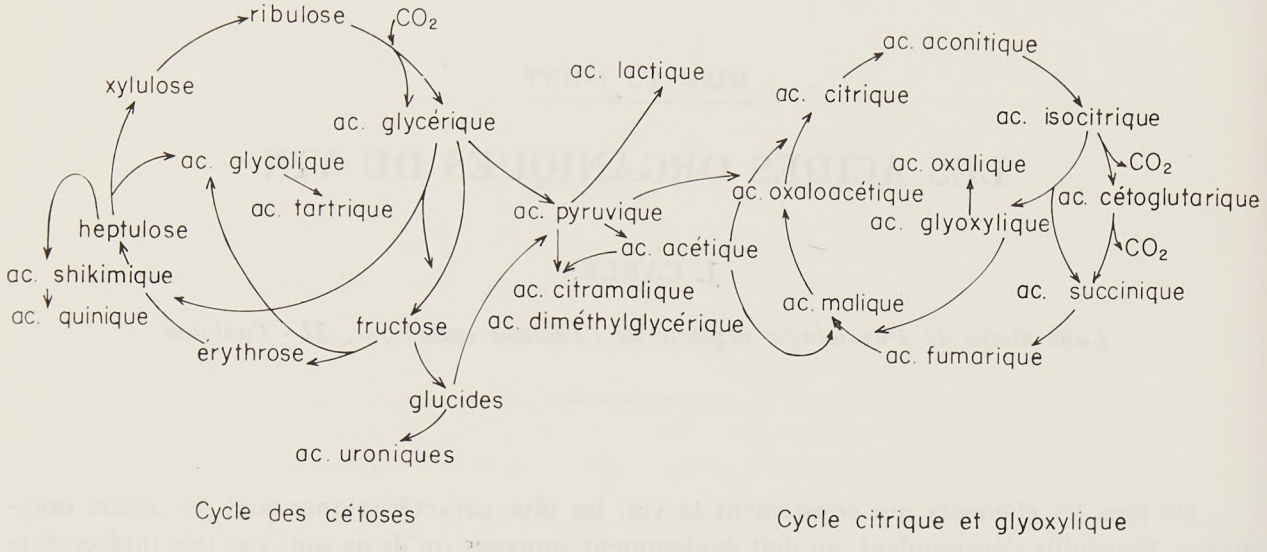


Fig. 1.

ces glucides pour la synthèse des acides aminés, la respiration, etc. et le cycle glyoxylique qui fonctionne surtout pendant la fermentation. Certains acides cependant apparaissent indépendamment et en marge de ces cycles.

Avant de donner une vue d'ensemble de leur histoire, nous allons considérer chacune de ces origines.

LE CYCLE DES CÉTOSES

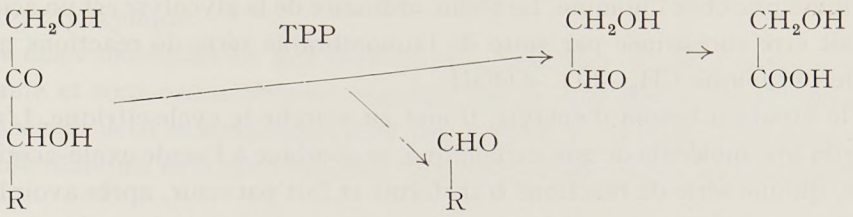
Ce cycle, ainsi nommé parce qu'il est constitué par les plus importants des oses à fonction cétonique, est le mécanisme essentiel de la photosynthèse glucidique.

Le gaz carbonique entre dans la matière vivante en se fixant sur un cétose-5 que cette arrivée casse en deux molécules tricarbonées. Deux de ces molécules s'unissent pour former le cétose-6, le fructose. Celui-ci perd une molécule dicarbonée, que remplace une des molécules tricarbonées précédentes pour former un cétose-7, l'heptulose, qui perd à son tour un fragment dicarboné pour donner naissance au cétose-5 sur lequel peut se fixer le CO_2... et le cycle recommence.

Par le fructose, qui s'isomérise très vite en glucose, ce cycle fournit les principaux glucides végétaux, le saccharose en particulier ; par l'heptulose il donne naissance à l'acide shikimique et aux corps aromatiques tels que les anthocyanes... Cependant un corps reste plus ou moins inemployé, une molécule dicarbonée apparue en deux endroits différents du cycle : la vigne s'en débarrasse en fabriquant de l'acide tartrique, COOH—CHOH—CHOH—COOH, et voici comment.

Ces fragments dicarbonés, dont on a reconnu depuis peu l'importance, sont détachés du fructose et de l'heptulose par l'action d'une enzyme, la transcétolase qui, grâce à l'intervention d'une thiamine pyrophosphate (TPP), ampute le cétose de deux chaînons carbonés, en sectionnant la

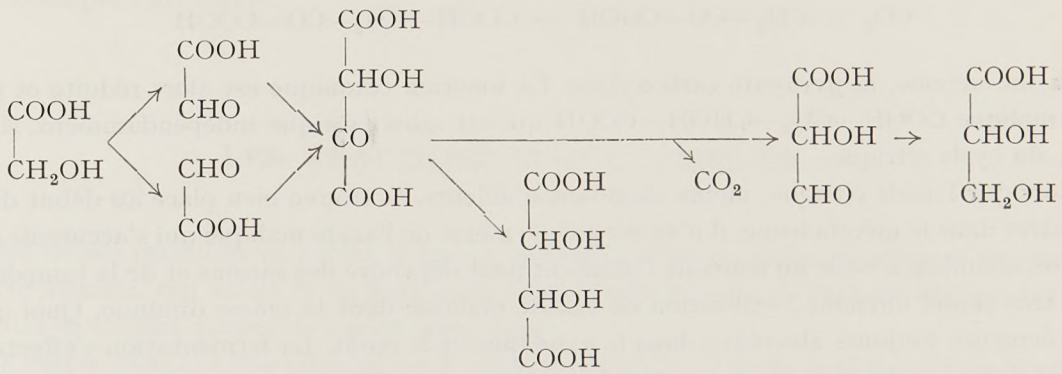
chaîne au niveau de la fonction cétonique. Le cétose, amputé de deux chaînons, oxyde son chaînon devenu terminal en aldéhyde, et devient ainsi un aldose.



De son côté le chaînon cétonique devient lui aussi aldéhyde et nous avons l'aldéhyde glycolique, ainsi nommé parce qu'il s'oxyde facilement en acide glycolique.

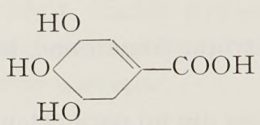
L'acide glycolique apparaît donc à partir de cet aldéhyde, qui peut aussi donner naissance à plusieurs autres corps, mais la vigne n'en reste pas à cette molécule dicarbonée.

Après que la fonction alcool de l'acide glycolique s'est oxydée en aldéhyde pour donner naissance à l'acide glyoxylique, deux de ces molécules s'unissent par leur fonction aldéhyde et nous arrivons à l'acide oxaloglycolique à partir duquel le métabolisme peut s'orienter dans deux voies différentes. La plupart des végétaux récupèrent cette substance : une décarboxylation se produit, qui conduit vers l'aldéhyde et l'acide glycérique à partir duquel devient possible la synthèse, soit du glucose, soit de beaucoup d'autres corps. La vigne s'oriente surtout dans une autre voie : la fonction cétonique est réduite et cette réduction est à l'origine de l'acide tartrique.

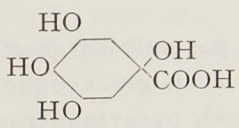


Ainsi la vigne se pourvoit en son principal acide, mais uniquement dans les tissus où la photosynthèse est très active, dans les feuilles lorsquelles sont jeunes, et dans les grappes qui commencent à se former. Une fois apparu, cet acide n'est guère utilisé par le métabolisme et s'accumule dans les tissus, en particulier dans le raisin mûrissant.

Le moût sera donc riche en acide tartrique, et comme les levures à leur tour ne s'intéresseront pas à cet acide, il se retrouvera massivement dans le vin à la fin de la fermentation, tandis que les autres acides apparus avec le cycle des cétoses, l'acide shikimique ou l'acide quinique, l'acide glycolique ou l'acide glycérique ne seront jamais très abondants.



ac. shikimique



ac. quinique

LE CYCLE CITRIQUE

Aussi bien pour les animaux que pour les végétaux, ce cycle est le pivot central du métabolisme intermédiaire ; grâce à lui, le vivant respire et réalise quelques-unes de ses plus importantes synthèses, celle des acides aminés par exemple.

Ce cycle est approvisionné par les glucides, le glucose en particulier qui se casse en deux fragments tricarbonés suivant un processus stéréotypé qui se retrouve chez tous les vivants, aussi bien chez les algues que chez l'homme. Le terme ordinaire de la glycolyse est un acide, dont l'importance ne saurait être surestimée par suite de l'innombrable série de réactions qu'il alimente ou produit, l'acide pyruvique CH_3—CO—COOH.

Lorsque le vivant a besoin d'énergie, il met en marche le cycle citrique. L'acide pyruvique, après avoir perdu une molécule de gaz carbonique, se combine à l'acide oxalo-acétique pour donner l'acide citrique, qu'une série de réactions transforme et fait parvenir, après avoir libéré deux molécules de CO_2 et accumulé le potentiel énergétique d'une douzaine de molécules d'ATP, jusqu'à l'acide oxalo-acétique qui permet au cycle de recommencer.

Nous n'insisterons pas sur les diverses étapes fort bien connues de ce cycle. S'il tournait régulièrement, on ne devrait trouver dans les tissus aucun des acides organiques qui le composent puisqu'ils se transforment aussitôt formés. Cependant, chez beaucoup de végétaux, et il en est ainsi de la vigne, les acides qui se situent à côté du point d'entrée deviennent plus ou moins importants, comme si l'entrée se faisait trop vite pour la rapidité du cycle, dont le débit serait inférieur à l'approvisionnement : l'acide citrique s'accumule en attendant d'être utilisé et l'acide malique est plus abondant encore. L'acide malique proviendrait donc de la trop grande abondance de l'acide pyruvique entrant dans le cycle, mais il peut en provenir directement.

Au lieu de libérer une molécule de CO_2 pour se fixer sur l'acide oxalo-acétique, l'acide pyruvique peut en fixer une et devenir acide oxalo-acétique

$$CO_2 + CH_3—CO—COOH \rightarrow COOH—CH_2—CO—COOH$$

grâce à un enzyme, la pyruvate carboxylase. La fonction cétonique est alors réduite et passe à l'acide malique COOH—CH_2—CHOH—COOH qui est ainsi fabriqué indépendamment, sinon en dehors, du cycle citrique.

Alors que l'acide citrique, moins abondant d'ailleurs, se trouve bien placé au début du cycle pour entrer dans le métabolisme, il n'en est pas de même de l'acide malique qui s'accumule davantage. Son abondance varie au cours de l'année et peut dépendre des saisons et de la température : un été très chaud entraîne l'utilisation de l'acide malique dont la masse diminue. Quoi qu'il en soit, il demeure toujours abondant dans la vendange et le moût. La fermentation s'effectue sans qu'il soit guère touché et le vin garde encore un temps ce goût acide caractéristique des vins nouveaux ; alors les bactéries entrent en jeu. Sous leur action, l'une des fonctions acides de l'acide malique est transformée en CO_2 : l'acide lactique apparaît et les vins anciens perdent la moitié de l'acidité qui provenait de l'acide malique disparu.

LE CYCLE GLYOXYLIQUE

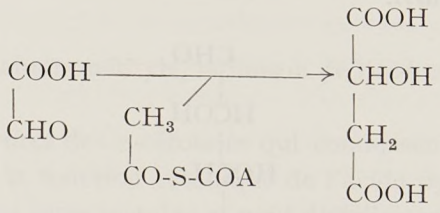
Si l'oxygène n'est pas suffisant pour que le cycle citrique fonctionne, les réactions prennent une nouvelle voie et le cycle glyoxylique entre en jeu.

Ordinairement, l'acide pyruvique trouve des conditions qui lui permettent, grâce à un enzyme, la pyruvate déshydrogénase, avec laquelle collaborent la thiamine-pyrophosphate, l'acide lipoïque et le DNP, de s'unir au coenzyme-A pour former ce qu'on appelle l'acétate actif CH_3—CO—S—CoA, tandis que se dégage une molécule de gaz carbonique. De multiples possibilités sont alors ouvertes.

Lorsque l'acide pyruvique s'engage dans la voie du cycle citrique, il se condense avec l'acide oxalo-acétique pour donner de l'acide citrique qui passe à l'acide aconitique et à l'acide isocitrique ; mais ici tout peut prendre deux voies différentes, suivant que le milieu est plus ou moins réducteur. Dans un milieu trop réducteur, les deux libérations successives de CO_2 ne peuvent avoir

lieu, mais une cassure se produit qui fait parvenir d'un seul coup jusqu'à l'acide succinique COOH—CH_2—CH_2—COOH, en libérant les deux chaînons carbonés qui n'ont pu s'oxyder et constituent l'acide glyoxylique.

Alors que les deux molécules de gaz carbonique n'ont dans le cycle citrique aucun intérêt pour le métabolisme et sont ordinairement expulsés par la respiration, l'acide glyoxylique peut être utilisé : un acétate actif se combinant avec lui, grâce à un enzyme, la malate synthétase, le transforme en acide malique, et le cycle continue, en abandonnant comme résidu l'acide succinique.



Alors que le cycle citrique, pour une molécule d'acétate qui entre, fait un tour de cycle et libère deux CO_2, dans le cycle glyoxylique, deux acétates doivent entrer pour que soit libérée une molécule d'acide succinique. La pénétration dans le cycle est deux fois plus rapide, mais l'énergie produite est très faible. Au lieu du dégagement de 3 molécules de gaz carbonique pour chaque molécule d'acide pyruvique, nous n'en avons plus qu'une, celle qui est libérée juste avant l'entrée, mais l'acide succinique s'accumule.

LES RÉACTIONS NON CYCLIQUES

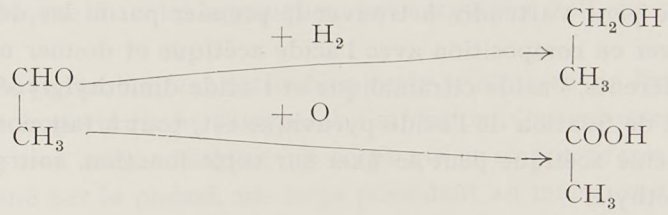
A côté de ces réactions en cycles, il en est beaucoup d'autres qui se produisent au cours de toute cette histoire, qui va de la formation du raisin jusqu'à la fin de la fermentation : les plus importantes se situent autour de l'acide pyruvique.

Pour entrer dans le cycle citrique ou le cycle glyoxylique, l'acide pyruvique doit oxyder sa fonction acide qui se transforme en gaz carbonique et se dégage, tandis qu'il se transforme en aldéhyde acétique. Il peut arriver que l'oxygène manque tellement que l'acide pyruvique, au lieu de s'oxyder et de perdre son carboxyle, est réduit, comme dans les muscles où s'accumule l'acide lactique.

$$CH_3—CO—COOH + H_2 \rightarrow CH_3—CHOH—COOH$$

L'animal récupère assez facilement cet acide lactique grâce à une enzyme, la lactico-déshydrogénase dont le végétal, et le vin surtout, ne disposent pas ; aussi bien, l'acide lactique qui se forme risque de s'accumuler et de persister.

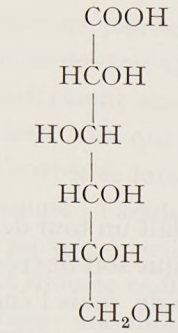
Si au lieu d'être réduit, l'acide pyruvique se décarboxyle, mais dans un milieu pauvre en oxygène, l'aldéhyde formé devient de l'alcool éthylique, tandis que si le milieu est assez riche en oxygène, ce sera de l'acide acétique.



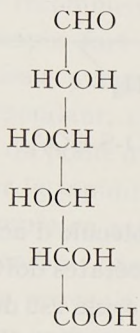
Il va sans dire que les œnologues veillent à ce que l'oxygène soit assez rare pour que le vin s'enrichisse en alcool et non pas en acide acétique.

Par suite de la cassure du glucose en deux fragments tricarbonés, l'acide pyruvique est le terme normal de la glycolyse. Il arrive pourtant que la glycolyse se fasse sans que la molécule de glucose se casse : le dernier chaînon carboné s'oxyde et forme un acide, mais ici encore l'oxydation peut se faire par l'un ou l'autre bout, ou même par les deux à la fois. De telles réactions ne se produisent que dans le raisin et elles touchent le glucose ou le galactose.

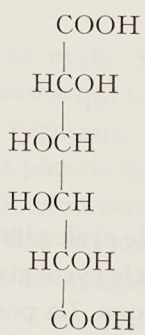
Le glucose est attaqué par les champignons à son extrémité aldéhydique : l'acide gluconique est toujours présent dans les vendanges botrytisées et dans les vins, qui, comme le Sauterne, sont fabriqués à partir de raisin pourri.



ac. gluconique



ac. galacturonique



ac. mucique

Le galactose est attaqué lui aussi, mais d'une manière plus régulière par l'autre bout de la chaîne, celle qui comporte un alcool primaire, et nous trouvons dans tous les vins de l'acide galacturonique.

On trouve même assez souvent de l'acide mucique, qui provient du galactose oxydé par les deux bouts et devenu ainsi diacide.

Les autres acides que l'on peut trouver dans le vin proviennent de réactions diverses.

Les acides formique H—COOH, propionique CH_3—CH_2—COOH, butyrique CH_3—CH_2—CH_2—COOH, etc., toujours en faible quantité, se forment en réactions secondaires de l'attaque des bactéries.

D'autres, tels que l'acide gallique, etc., se forment par dégradation des anthocyanes, mais ils ne présentent guère d'importance pratique.

Les corps les plus abondants sont ceux qui proviennent de l'acide pyruvique, ceux qui représentent un aboutissement normal lorsqu'il n'entre pas dans le cycle : l'acide lactique, l'alcool et l'acide acétique. Il existe un mécanisme, naguère insoupçonné, qui permet d'empêcher la trop grande augmentation de ces produits en les unissant l'un à l'autre : ainsi s'unissent l'acétate et le pyruvate.

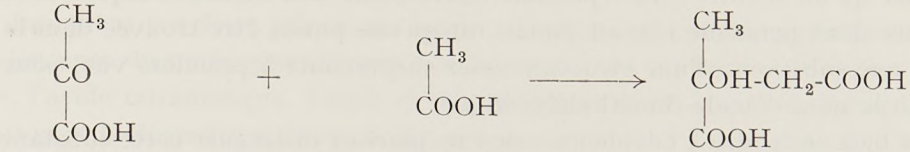
LES RESYNTHÈSES

Les deux acides pyruvique et acétique ont tous les deux une très grande importance dans le métabolisme et l'on ne peut s'attendre à trouver le premier parmi les déchets irrécupérables : cependant, il peut entrer en composition avec l'acide acétique et donner naissance à deux acides très voisins et très différents, l'acide citramalique et l'acide diméthylglycérique.

Alors que le point de fixation de l'acide pyruvique est, tout à fait normalement, la fonction cétonique centrale, l'acide acétique peut se fixer sur cette fonction, soit par sa fonction acide, soit par sa fonction méthyle.

La fixation de l'acide acétique par la fonction méthyle est la plus ordinaire : c'est ainsi qu'il entre dans le cycle citrique en se fixant sur la fonction cétonique de l'acide oxalo-acétique : grâce à l'énergie fournie par un enzyme, l'hydrogène de la fonction méthyle est rendu mobile par la liaison

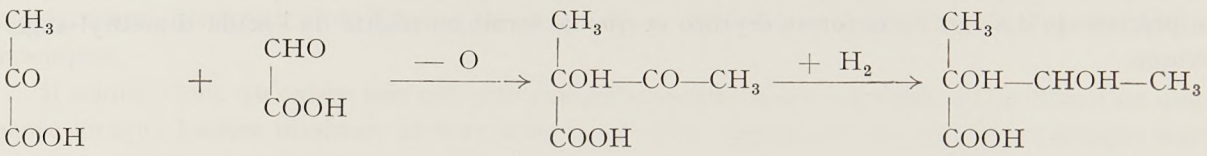
thioester et peut se fixer sur une des valences du carbone cétonique, rendant ainsi possible la liaison des deux chaînes carbonées. Le résultat de cette liaison est l'acide citramalique.



ac. pyruvique ac. acétique ac. citramalique

Au lieu de se faire par le chaînon méthylé, la liaison de l'acétate avec l'acide pyruvique peut se faire par le chaînon oxydé.

Il a été trouvé chez les levures des α-cétolases qui condensent l'acétaldéhyde actif (fixé sur la thiamine-pyrophosphate) sur la fonction cétonique de l'acide pyruvique, et l'on arrive ainsi à l'acide acétolactique. Cet acide est assez instable et peut difficilement se trouver dans les végétaux ou être conservé à l'état libre : il lui arrive, soit de se décarboxyler pour devenir acétoïne, soit de réduire la fonction cétonique apparue ; cette réaction est semblable à celle qui produit l'acide lactique à partir de l'acide pyruvique, et le corps obtenu est l'acide diméthylglycérique.



ac. pyruvique ac. acétique ac. acétolactique ac. diméthylglycérique

Ces deux acides dont la formation paraît simple et la présence naturelle, étaient, naguère encore, absolument insoupçonnés, et personne ne pensait qu'ils pouvaient exister dans le vin.

L'acide citramalique fut découvert dans les pelures de pommes par Hulme ; quelques milligrammes de ce corps qu'il avait isolé nous permirent d'identifier dans le vin ce nouvel acide tout à fait inattendu. Il n'apparaît pas dans le raisin, mais seulement au cours de la fermentation, et pourtant un détail nous laisse deviner quelques relations entre la pomme et le vin. Cet acide est très abondant dans la pelure des pommes, comme nous l'avons remarqué dans les pommes de la variété *Golden*. Or, il arrive que les pommes de cette variété soient atteintes d'une « maladie » ou malformation, la rugosité, qui fait disparaître cet aspect lisse et légèrement cireux, pour un aspect rugueux et même finement craquelé. L'acide citramalique tend à disparaître dans ces conditions, sans doute parce qu'au lieu de la couche cireuse qui isolait la partie intérieure de la pelure où se forme l'acide citramalique, la pelure bien moins isolante laisse pénétrer de l'air, et l'acide citramalique ne se forme plus, parce que l'acide pyruvique s'oxyde et disparaît. Or, dans la fermentation, l'oxygène se fait de plus en plus rare, et ceci expliquerait l'apparition de l'acide citramalique ; ceci expliquerait aussi pourquoi, lorsqu'on trouble la fermentation en faisant arriver de l'air, l'acide citramalique ne se forme plus.

L'acide diméthylglycérique est à peu près aussi abondant d'ordinaire dans le vin que l'acide citramalique. Il a été beaucoup plus difficile, non pas de le trouver, mais de l'identifier. Il suffit de faire une chromatographie d'acides organiques, soit sur papier, soit sur colonne de silice, pour l'apercevoir et le doser.

Ainsi, sur le chromatogramme, une tache bien nette se situe en un lieu où ne va aucun des acides connus : elle est importante et s'impose à l'attention. Que représente-t-elle ? Un monoacide car il va assez loin en milieu basique, un corps qui ne comporte pas de noyau aromatique car il n'est guère entraîné par le phénol, un corps possédant au moins une fonction alcool car il serait sans cela très mal révélé. De telles données sont précieuses, mais le nombre de corps répondant à ce signalement est assez nombreux. Tous les corps connus furent essayés, tous ceux dont il est question dans tel ou tel métabolisme : aucun ne répondit parfaitement à ce que nous savions

déjà de ce corps. De guerre lasse, fut entreprise la synthèse de toute une série de corps plus ou moins invraisemblables et de tous ces corps était pris un signalement chromatographique.

Or, voilà qu'un d'entre eux répondait exactement aux caractéristiques attendues. C'était une substance dont personne n'avait jamais dit qu'elle puisse être trouvée dans le monde vivant ou minéral, une substance d'une structure assez surprenante à première vue, pour laquelle nous avons retenu le nom d'acide diméthylglycérique.

Il fallut bien se rendre à l'évidence : rien ne pouvait distinguer cette substance synthétique de celle qui se trouve dans le vin, les réactions de révélation, ni la localisation sur chromatogrammes avec toutes sortes de solvants : il existe donc, dans le vin, de l'acide diméthylglycérique.

Un point précis restait à résoudre, la structure de cet acide. La formule qui le représente, par suite de la présence de deux carbones asymétriques, peut être figurée dans l'espace de quatre façons différentes. Du point de vue chimique, aucune de ces structures ne paraît tout à fait privilégiée et la synthèse aboutit à un mélange de ces différents corps.

Du point de vue biologique, il paraît cependant invraisemblable que la levure ou les enzymes qu'elle sécrète n'aient pas opté pour une structure bien précise, pour une forme stéréoisomère à l'exclusion de toute autre. Quelle est celle-là ? Grâce à un échantillon de corps naturel découvert et isolé dans le cidre par WHITING et que nous avons étudié comparativement par toutes les méthodes possibles, par spectrographie de résonance magnétique nucléaire en particulier, nous avons pu préciser qu'il s'agit de la forme érythro et que ce serait en réalité de l'acide diméthyl-anglycérique.

HISTOIRE DES ACIDES DU VIN

L'histoire des acides organiques du vin commence au printemps avec l'étalement et la croissance des feuilles, avec le premier développement des grappes. La chlorophylle abonde et la photosynthèse très active accumule dans la vigne un de ses sous-produits, l'acide tartrique. La vigne en est inondée et la grappe mûrissante en prendra largement sa part.

Cependant, les processus métaboliques entrent en jeu et le cycle citrique permet à la vigne de respirer et de synthétiser ses acides aminés : l'acide citrique devient discernable à l'analyse tandis qu'augmente considérablement l'acide malique dont le niveau peut atteindre ou même dépasser celui de l'acide tartrique.

Une analyse fine permet de découvrir les autres acides organiques, tels que l'acide galacturonique, l'acide quinique ou shikimique, l'acide glycolique, etc, mais on peut néanmoins dire que l'acidité de la vigne est essentiellement constituée par deux acides, le malique et le tartrique : la plupart des autres sont souvent passés inaperçus.

Dans le raisin et le moût nous retrouvons ces deux acides qui représentent souvent à eux seuls plus des neuf dixièmes de l'ensemble.

La diversification va se réaliser dans le vin à la suite de la fermentation qui fait apparaître de nouveaux acides, tandis que décroissent les acides tartrique et malique.

L'acide tartrique diminue dans le vin pour une raison purement physique, parce que le bitartrate de potassium, qui se forme normalement avec le potassium du moût, devient plus insoluble par suite de la convergence de trois conditions qui vont toutes les trois dans le sens de son insolubilisation : la fermentation fait apparaître et augmenter l'alcool, l'acidité diminue par le fait de la disparition de l'acide malique, et la température de l'hiver refroidit plus ou moins l'ambiance des caves ; et c'est ainsi que tout concourt à faire déposer dans les tonneaux, pendant la mauvaise saison, des quantités relativement importantes de tartre.

L'acide malique décroît à son tour par suite de l'attaque des bactéries qui sont à l'origine de la fermentation malo-lactique.

$$COOH—CHOH—CH_2—COOH \rightarrow CO_2 + CH_3—CHOH—COOH$$

Du gaz carbonique se dégage et chacune de ces molécules perd la moitié de son acidité. L'attaque bactérienne se poursuit jusqu'au bout, tant et si bien que l'acide malique ne reste plus dans la plupart des vins qu'à l'état de traces.

Alors que diminuent ces deux principaux acides, d'autres ont apparu pendant la fermentation dans les alentours du cycle glyoxylique, l'acide succinique et l'acide acétique, mais aussi l'acide lactique, l'acide citramalique, l'acide diméthylglycérique et quelques autres encore.

La diminution et la disparition de ces acides est compensée par l'apparition de l'acide succinique, de l'acide acétique et de l'acide lactique, par celle de l'acide citramalique et de l'acide diméthylglycérique, et par un certain nombre d'autres acides moins importants.

Le problème de l'origine de ces acides, ou plus exactement des conditions dans lesquelles ils apparaissent, est assez complexe et fort mal connu.

L'acide diméthylglycérique et l'acide citramalique, par exemple, apparaissent dans le vin, aussi bien que dans les fermentations ordinaires, en quantités équivalentes, 8 p. 100 du total des acides pour le premier et 7 p. 100 pour le second. Cet équilibre est très instable. Il suffit de remplacer comme source azotée l'acide aspartique par du sulfate d'ammoniaque pour que l'acide diméthylglycérique représente 20 p. 100 des acides organiques, tandis que l'acide citramalique n'en représente plus que 2,3 p. 100 soit près de dix fois moins.

Plus surprenant encore est l'effet du remplacement du glucose par du galactose : l'acide diméthylglycérique disparaît, alors que l'acide citramalique en arrive à représenter 20 p. 100 des acides organiques.

Il semble donc qu'existe une certaine complémentarité entre ces deux acides dont l'un augmente lorsque l'autre diminue, et leur somme est alors supérieure à ce qu'elle est lorsque leurs quantités sont à peu près égales.

L'acide diméthylglycérique paraît varier à peu près dans le même sens que l'acide lactique, augmentant avec lui ou disparaissant avec lui, tandis que l'acide citramalique varie en sens inverse et d'une manière comparable à celle des acides citrique, malique et succinique.

Au terme de cette étude, nous pouvons dire que nous connaissons la plupart des acides organiques qui peuvent apparaître dans le vin ; nous voyons même comment ils peuvent se former à partir des éléments existants ; mais nous ignorons les conditions précises de cette apparition ; nous ne savons pas ce qu'il conviendrait de faire pour que varient leurs proportions dans le sens que nous pourrions désirer.

Et pourtant de toute la technologie du vin, c'est bien cette connaissance qui nous serait la plus utile pour diriger la lente élaboration d'un vin fin et reproduire volontairement les conditions qui, par hasard sans doute, ont contribué à faire que tel fût ou telle bouteille réalise, sans que nous sachions au juste pourquoi, sans que nous puissions le reproduire, un merveilleux, un ineffable bouquet.

Reçu pour publication en avril 1969.

SUMMARY

ORGANIC ACIDS OF WINE

The organic acids of wine come from the intermediary metabolisms of Vine or from fermentation.

A try of a restatement of that origin after the last works.

ZUSAMMENFASSUNG

ORGANISCHEN SAÜREN DES WEINES

Die organischen Saüren des Weines stammen aus dem Zwischenmetabolismus der Weinrebe oder aus der Gärung ab.

Versuch einer Klarstellung dieser Abstammung nach den letzten Arbeiten.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALQUIER-BOUFFARD A., 1969. *Évolution des acides organiques et des glucides du rameau de vigne.* Thèse Doctorat, Toulouse.

CARLES J., LAMAZOU-BETBEDER M., PECH R., 1958. Existe-t-il une fermentation citramalique dans le vin ? *C. R. Acad. Sci.*, **246**, 2160-2162.

CARLES J., LAYOLE J., LATTES A., 1966. Un nouvel acide organique du vin, l'acide diméthylglycérique. *C. R. Acad. Sci.*, **262**, série D, 2788-2790.

CARLES J., TALIEU-ROUSSEAU M., MONTANT C., 1967. Contribution à l'étude des acides organiques de la fermentation. *C. R. Acad. Sci.*, **265**, série D, 1183-1186.

CARLES J., 1968. Quelques aspects biochimiques de la rugosité des pommes. *C. R. Acad. Sci.*, **266**, série D, 2078-2080.

LAYOLE J., LATTES A., WHITING G. C., CARLES J., 1967. Détermination de la configuration de l'acide diméthyl-2-3-glycérique naturel *C. R. Acad. Sci.*, **265**, série C, 1277-1279.

MAROC J., 1967. La conversion du glycolate en glucose et ses relations avec la biogenèse de l'acide tartrique. *Physiol. vég.*, **5**, 37-46.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement,* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *sommaire :* résumé suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats,* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds les dons...; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet.* Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de et *al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé selon la *World List of Scientific Periodicals,* ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des Annales est : 16 × 24 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12,4 photos 9 × 55,6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront une épreuve à corriger.

Envoi du manuscrit : M. Flanzy, Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne, France, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, 78 - Jouy-en-Josas. On demande deux exemplaires.

Le Directeur de la publication: M.-L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 12-1969

Dépôt légal: 4e trimestre 1969. N° d'impression: 1553.

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 18 1969 NUMÉRO 4

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (4), 279-291.

QUALITÉS ORGANOLEPTIQUES DE LA VIANDE DE VEAU CONGELÉE DANS LA FABRICATION DE PRODUITS DE CHARCUTERIE ET DE SALAISON

B. JACQUET, J. ARNOUX et J. GAILLARDON
avec la collaboration technique de J.-P. MONGIN et M. PINSON

Laboratoire de Charcuterie expérimentale, Centre technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes, 78 - Jouy-en-Josas
Station de Biométrie, Centre national de Recherches agronomiques, 78 - Versailles
Institut national de la Recherche agronomique
Société interprofessionnelle du Bétail et des Viandes, 75 - Paris

---

SOMMAIRE

Les auteurs, compte tenu de la conjoncture économique et des exigences du consommateur, ont cherché à apprécier les possibilités d'incorporation du veau congelé dans les produits de charcuterie industrielle.

Les résultats du Test Triangulaire appliqué à un jury de dégustation ont montré que les qualités organoleptiques des produits fabriqués à base de veau congelé sont sensiblement comparables à celles des produits traditionnels : toutefois l'aspect est généralement plus clair.

Les goûts du consommateur, les réticences du fabricant et la recherche de débouchés à la production paraissent conciliables.

INTRODUCTION

L'industrie de la viande, actuellement, tend à utiliser de plus en plus fréquemment de la viande congelée comme matière première dans ses fabrications ; cela tient principalement à deux causes :

— compte tenu du marché de l'offre et de la demande, les sources d'approvisionnement, situées bien souvent au-delà des frontières, sont parfois assez éloignées du lieu de transformation ;

— le fabricant, de par les fluctuations des cours de la matière première, cherche à avoir une bonne rotation de son stock au meilleur prix.

Par ailleurs, la S. I. B. E. V., (1) pour régulariser les cours, intervient en stockant une certaine quantité de viande qu'elle restitue au marché lorsque la demande s'en fait sentir ; le problème est de valoriser au mieux cette viande congelée, en particulier les quartiers-avants ; bien souvent l'aspect économique du problème se heurte à la mentalité ou aux habitudes du fabricant, liées pour beaucoup aux exigences du consommateur, qui répugne à utiliser tout ou partie de viande congelée dans certaines fabrications.

Il apparaissait donc que cette étude, résultant d'une convention passée le 21 août 1967 avec le F. O. R. M. A., (1) présentait un intérêt économique certain et revêtait par voie de conséquence un aspect psychologique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — *Matériel*

La S. I. B. E. V. a acquis une cinquantaine de tonnes de carcasses de veau en août, septembre, octobre 1967.

L'achat a porté sur des carcasses pesant de 80 à 120 kg et également sur un lot de 65 carcasses lourdes pesant de 130 à 150 kilos.

Les veaux ont été abattus et traités dans les installations de la S.I.C.A.V.I.A.C à Villefranche-d'Allier.

Il a été procédé au désossage d'une centaine de carcasses, avec mise des viandes désossées en caisse carton ou en ballot de jute.

Les autres carcasses ont été conservées avec os et entreposées sous forme de carcasses entières ou de quartiers (avants doubles avec capa à 5 côtes — pans doubles à 8 côtes, ou avants

TABLEAU I

Caractéristiques des différents lots utilisés dans la fabrication des produits de charcuterie

Produits fabriqués	N° lot	Quantité	Congélation	Habillage polyét. et stockin.	Ressuyage
3	A_3	21 AV doubles	rapide	après congélation	normal
4	A_6	14 veaux entiers	rapide	après congélation	sans
2-6-10-12	$A_7 \times B$	21 AV doubles de veau lourd	rapide	avant congélation	normal
1-5-9-11-14	A_2	15 AV doubles désossés en caisse	rapide	—	normal
8	A_3-A_6	40 AV doubles désossés en caisse	rapide	—	normal
7-13	A_5	12 AV doubles désossés ballot de jute	rapide	—	normal

(1) C. T. S. C. C. V : Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viande.
F. O. R. M. A : Fond d'Orientation et de Régularisation des Marchés Agricoles.
S. I. B. E. V : Société Interprofessionnelle du Bétail et des Viandes.
S. I. C. A. V. I. A. C : Société d'Intérêt Collectif Agricole des Viandes Abattues du Centre.

simples — pans simples). Les viandes ont été habillées sous polyéthylène et stockinette, soit avant, soit après congélation. Certains lots ont subi une congélation rapide à — 35° au tunnel, avec ou sans ressuyage.

Au moment de la mise en congélation, des mesures de la couleur, du pH et de la rétention d'eau ont été prises par CHARPENTIER de la Station de Recherches sur la Viande de l'I. N. R. A.

Après une durée moyenne de quatre mois de stockage, les viandes ont été transférées sur un entrepôt frigorifique de Paris.

Un certain nombre d'industriels acceptèrent de collaborer à l'expérience en achetant des quartiers AV de veau (tabl. 1). La viande de veau fut incorporée en remplacement total ou partiel d'une autre viande dans une ou plusieurs fabrications courantes.

Un questionnaire était envoyé à chacun d'entre eux, questionnaire que nous reproduisons pour l'essentiel :

- Observations viande de veau après décongélation :

— humidité : extrêmement humide, très humide, humide, normale, sèche ;
— couleur : blanche, rose, rose foncée, foncée et en plus « fraîche » — « fanée » ;
— odeur : normale, anormale.

- Questions portant sur la fabrication proprement dite :

— nature du produit fabriqué ;
— la viande de veau congelée a-t-elle été utilisée en remplacement de veau ordinaire, bœuf, porc ou autre viande ;
— pourcentage de veau congelé par rapport à la totalité de viande utilisée et par rapport au poids total de matière première mise en œuvre ;
— rendement.

Enfin, il était demandé à chaque fabricant d'envoyer au laboratoire un échantillon de produit fini fabriqué avec le veau congelé et un échantillon du produit standard correspondant, conditionnés sous vide dans des sachets « sans marque ».

Par produit « standard » on entend la fabrication courante de l'industriel considéré, qu'elle comprenne ou non de la viande de veau.

B. — *Méthode de dégustation « triangulaire »*

Le jury de dégustation de 25 personnes comprenait des représentants du F. O. R. M. A., de la S. I. B. E. V., de l'I. N. R. A. et du C. T. S. C. C. V.

La méthode consiste essentiellement à présenter aux dégustateurs trois échantillons repérés par des lettres, l'un des deux produits (Veau ou Standard) étant représenté par un ou deux échantillons : chaque dégustateur doit désigner celui des trois échantillons qui diffère des deux autres. Cette méthode se prête à l'analyse statistique, la désignation correcte ayant une probabilité de 0,33 si aucune différence n'est décelable et si en conséquence la reconnaissance de l'échantillon unique a été faite au hasard.

De plus, on a demandé aux dégustateurs de répondre aux trois questions supplémentaires suivantes :

- l'avez-vous désigné au hasard ?
- lequel préférez-vous ?
- ces produits sont-ils commercialisables ?

RÉSULTATS

A. — *Qualité de la viande de veau après décongélation*

Certains fabricants ont répondu très incomplètement au questionnaire qui leur avait été transmis ; ainsi, il est difficile de donner une appréciation d'ensemble : en général, la viande après décongélation était humide, de couleur rose, donnant une impression de fraîcheur et d'odeur normale.

B. — *Formule de préparation des produits fabriqués*

Le calcul du test t appliqué aux deux séries de rendement placées en parallèle donne $t = 1{,}14$ (S à P 0,30). Pas de différence significative entre les rendements

des produits appariés. Le niveau de signification conjugué au nombre relativement faible d'échantillons ne nous permet pas de supposer *a priori* une tendance à des rendements plus faibles avec le veau congelé.

TABLEAU 2

Produit fabriqué	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
En remplacement de ..	Bf	Bf	V. ord.	Bf	Pc	Bf	Pc	V. ord.	Pc-Bf	Bf	Bf	Bf	Bf	—
% Veau/total viande ..	100	100	100	50	50	100	100	100	— 29	100	50	50	100	—
% Veau/poids total ...	15	32	50	—	6	15	20	25	16	14	9	17	35	—
Rendement matière Veau	—	92,0	94,0	82,0	—	93,2	88,5	—	—	91,7	—	91,5	94,1	—
Rendement matière Standard .	—	92,2	93,3	89,0	—	94,5	91,5	—	—	92,9	—	93,5	89,5	—

Bien qu'un certain nombre de résultats manque, on remarquera la variabilité du pourcentage de veau congelé en remplacement d'une autre viande.

Dans tous les cas le produit fabriqué à base de veau congelé présentait une coloration plus claire que le produit standard.

C. — *Dégustation*

Au total, le jury de dégustation avait à apprécier la qualité de 28 produits de charcuterie en fabrication industrielle, répartis en six types de préparations à base de viande (six classes) et couplés deux par deux, chaque couple de produits (Veau-Standard) numéroté de 1 à 14 étant présenté à chaque dégustateur sous forme de trois échantillons.

En fait, l'exploitation statistique de la dégustation n'a porté que sur les résultats de 20 dégustateurs, 5 personnes n'ayant pas satisfait aux tests minimaux exigés.

1. *Désignation de l'échantillon unique et degré de hasard dans la détermination.*

Ainsi, pour neuf couples de produits, la reconnaissance de l'échantillon unique s'est faite de façon très hautement significative — désignation de façon significative pour un autre couple de produits ; il est important de noter que, conformément à l'appréciation des fabricants eux-mêmes, la couleur lors de la dégustation a été le meilleur critère de différenciation.

Quant aux quatre autres paires de produits, le pourcentage de détection correcte ne dépasse pas significativement le taux de 33 p. 100 qu'on obtiendrait par des réponses au hasard en l'absence de toute différence décelable.

On constate par ailleurs — et ceci correspond à la nature même du test triangulaire — que le nombre de réponses « non au hasard » est en corrélation avec le nombre de réponses justes.

TABLEAU 3

Classe des produits	Produits	Échantillon unique	Signification	Non au hasard
M	1	19	***	15
M	2	9	—	6
M	3	19	***	18
M	4	20	***	20
R	5	15	***	12
P	6	17	***	16
P	7	14	***	13
Q	8	9	—	8
S-P	9	11	*	10
S-P	10	9	—	6
S-C	11	14	***	12
S-C	12	16	***	14
S-C	13	8	—	7
S-C	14	18	***	17

M = mortadelle R = roulade P = pâté Q = quenelle
S-P = saucisson de Paris S-C = Strasbourg-Francfort.
Signification des résultats :
*** La reconnaissance de l'échantillon unique est expliquable respectivement dans au moins 95, 99,9 p. 100 des cas par une réelle différence (différence significative) ;
— Pas de différence sensible (différence non significative).

2. *Test de préférence.*

L'interprétation de la question posée introduisit chez un certain nombre de dégustateurs une confusion entre le « pas de préférence » à la fois pour le produit à base de veau congelé et le produit standard et une préférence pour les deux produits. Ainsi, les premiers eurent une démarche négative alors que la démarche des suivants fut positive.

Il fut convenu de classer ces deux groupes de réponses sous la mention « pas de préférence », étant donné que dans chacun des cas, le dégustateur n'avait pas plus de préférence pour le « veau congelé » que pour le « standard ».

En définitive, il y avait trois réponses possibles :

préférence veau,
préférence standard,
pas de préférence.

Le tableau de contingence à 14 lignes et 3 colonnes montre que la répartition des trois réponses possibles (V, S ou N) diffère notablement entre les 14 produits.

Cette hétérogénéité de répartition calculée par un test χ^2 (86,43 avec 26 degrés de liberté) montre qu'elle est significative.

TABLEAU 4

Résultat global du test préférence

	Préférence			Préférence		Préférence		Préférence	
	V	S	N	V	S + N	S	N + V	N	V + S
Produits									
Code	P_1			P_2		P_3		P_4	
1	2	13	5	2	18	13	7	5	15
2	3	6	11	3	17	6	14	11	9
3	6	13	1	6	14	13	7	1	19
4	7	11	2	7	13	11	9	2	18
5	12	1	7	12	8	1	19	7	13
6	4	10	6	4	16	10	10	6	14
7	8	6	6	8	12	6	14	6	14
8	5	3	12	5	15	3	17	12	8
9	6	1	13	6	14	1	19	13	7
10	1	3	16	1	19	3	17	16	4
11	5	8	7	5	15	8	12	7	13
12	5	6	9	5	15	6	14	9	11
13	1	9	10	1	19	9	11	10	10
14	8	9	2	8	11	9	10	2	17
Classe de produits									
Code	C_1			C_2		C_3		C_4	
M	18	43	19	18	62	43	37	19	61
R	12	1	7	12	8	1	19	7	13
P	12	16	12	12	28	16	24	12	28
Q	5	3	12	5	15	3	17	12	8
S-P	7	4	29	7	33	4	36	29	11
S-C	19	32	28	19	60	32	47	28	51

V = Veau S = Standard N = Pas de préférence.

Nous avons tenté d'analyser cette hétérogénéité en groupant d'une part les produits en différentes classes correspondant à des types de fabrication similaire, d'autre part deux types de réponses sur trois suivant trois combinaisons possibles ; on a obtenu ainsi des analyses du χ^2 global.

Ces diverses analyses ont montré que la constitution de « groupes » réunissant soit plusieurs produits (classes), soit plusieurs types de réponses, soit des combinaisons des deux, ne permettait pas de mettre en évidence une hétérogénéité moins marquée à l'intérieur de ces « groupes » qu'entre eux.

A titre d'exemple, nous donnons le schéma de l'analyse relative aux réponses groupées S + N.

TABLEAU 5

Calcul de χ^2

Code	Nombre de réponses	Degré liberté	χ^2
P_1	279	26	86,431
C_1	279	10	53,931
P_2	279	13	31,151
C_2	279	5	14,555
P_3	279	13	46,889
C_3	279	5	36,018
P_4	279	13	53,820
C_4	279	5	32,465

Dans cette analyse, le premier contraste correspond au test d'hétérogénéité entre les deux groupes de réponses (V d'une part, S + N d'autre part) vis-à-vis des diverses classes de produits définies ci-dessus; le deuxième au test entre les mêmes groupes de réponses vis-à-vis des produits à l'intérieur de leurs classes respectives; les troisième et quatrième contrastes sont analogues, mais test d'hétérogénéité entre les réponses S et N.

Désignation	χ^2	Degré de liberté
Contrastes V/S + N et classes ...	14,55	5
Contrastes V/S + N et produits à l'intérieur des classes	16,60	8
Contrastes S/N et classes	39,38	5
Contrastes S/N et produits à l'intérieur des classes	15,90	8
Total	86,43	

Cependant, le tableau 4 nous montre que la différence entre réponses est plus accentuée entre la préférence pour le standard et pas de préférence. La préférence entre le « Veau » et le « Standard » est sensible, dans la mesure où il y a une différence marquée. Les différences entre les réponses des différents dégustateurs ne sont pas plus marquées entre classes de produits qu'à l'intérieur d'une classe.

Si l'on considère l'ensemble des réponses quel que soit le produit, on obtient en pourcentage :

préférence veau : 26,2 p. 100
préférence standard : 35,5 p. 100
pas de préférence : 38,3 p. 100

avec une très légère préférence pour le standard dans le cas où une préférence a été indiquée.

Or, on a constaté que, suivant les produits, cette répartition était très hétérogène et que cette hétérogénéité ne pouvait être schématisée en classant les produits par type de préparation. Il convient donc de caractériser individuellement les divers produits selon les fréquences des réponses observées.

TABLEAU 6

Pourcentage de préférence accordé par les 20 dégustateurs suivant les différents produits

Produits	Veau	Standard	Pas de préférence
1	10	65	25
2	15	30	55
3	30	65	5
4	35	55	10
5	60	5	35
6	20	50	30
7	40	30	30
8	25	15	60
9	30	5	65
10	5	15	80
11	25	40	35
12	25	30	45
13	5	45	50
14	42	47	11

	10	20	30	40	50	60	70	80	% de préférence
Veau sup. à standard				7		5			
Standard sup. à veau			12	11-13-14-6-4		3-1			

En se référant aux tableaux 1 et 2, ces résultats nous montrent que les variations observées ne présentent aucune relation avec :

— les caractéristiques des différents lots de Veau congelé ;

— les différentes classes de produits ;

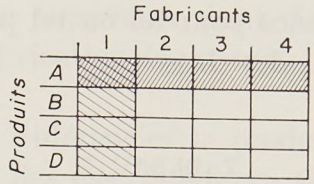
— la nature de la viande en substitution du veau dans le produit standard ;

— le pourcentage de veau congelé ajouté lors de la préparation du produit.

Ainsi, il nous faut constater le manque de liaison entre les facteurs liés à l'expérimentation proprement dite et la préférence du jury pour l'un quelconque des échantillons.

L'hétérogénéité qui persiste dans les réponses entre produits de même nature (de même classe) peut paraître *a priori* anormale. Peut-être s'explique-t-elle par la spécificité de chaque produit fabriqué.

Supposons avoir obtenu les mêmes produits par tous les fabricants : le produit A par exemple sera fonction de la qualité de la matière première et de la technologie mise en œuvre dans chaque fabrication ; dans une même usine, des facteurs aléatoires sont inhérents à la fabrication de chaque produit.



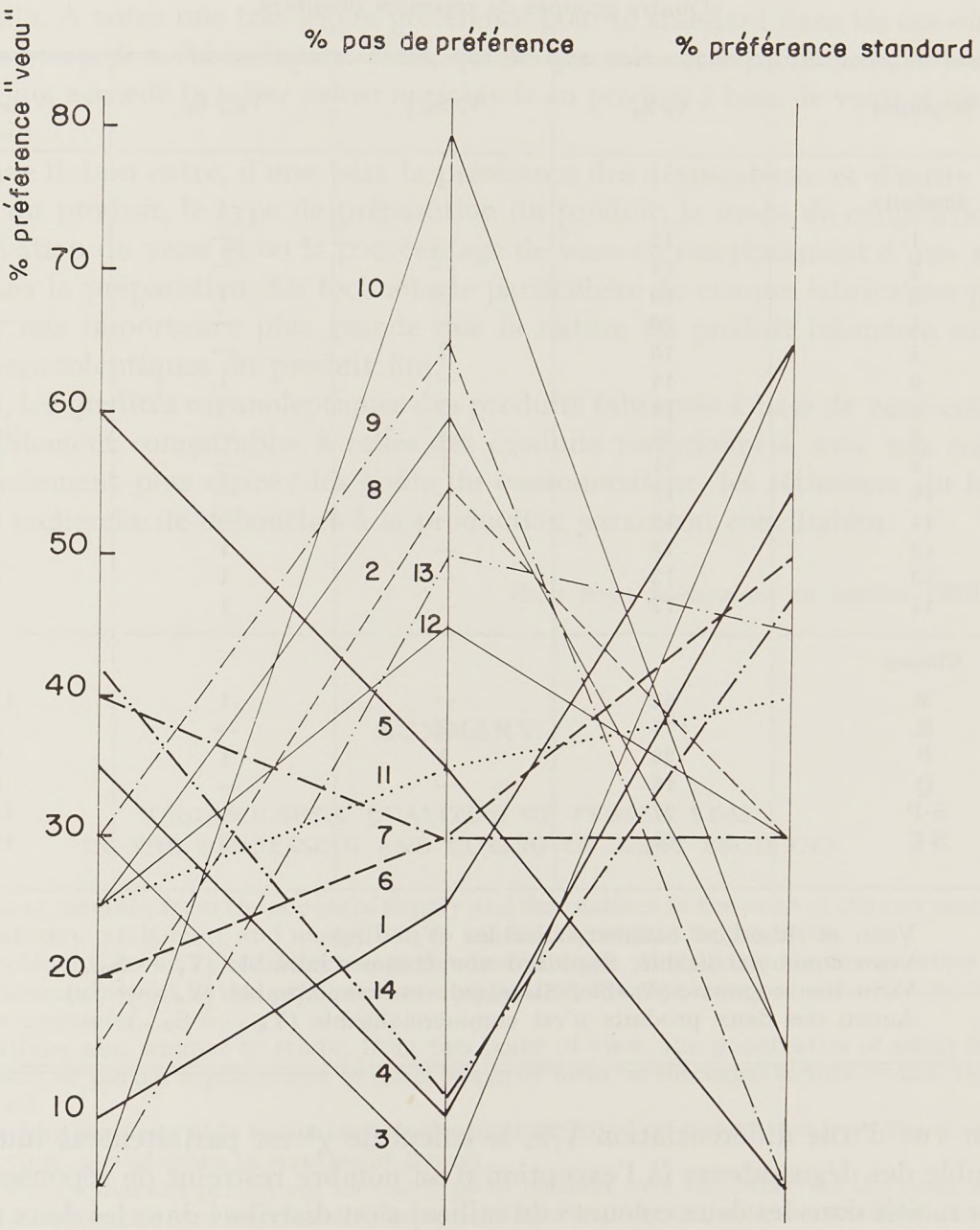


Fig. 1. — *Transposition des résultats du tableau 6 sur un graphique à trois variables*
unité de mesure : pourcentage de réponses du jury de dégustation
Produits dont le pourcentage « pas de préférence » est supérieur à 50 p. 100 : 2-8-9-10.
Produits que nous éliminons étant donné qu'ils n'ont fait l'objet d'aucune préférence sensible.
Produits dont le pourcentage « pas de préférence » est inférieur à 50 p. 100.

Aussi, les caractères propres à chaque fabrication peuvent-ils avoir plus d'importance que la nature même du produit sur les incidences organoleptiques à la dégustation.

Ceci nous montre que nous n'aurions probablement pas obtenu plus de résultats en planifiant l'expérience qu'avec les quelques échantillons fournis par l'industrie.

En définitive, compte tenu de la variabilité aléatoire de chaque produit d'une fabrication à l'autre, la préférence pour tel ou tel produit paraît se distribuer « au hasard » à l'intérieur de chacune des classes.

3. *Test de commercialisation.*

TABLEAU 7

Résultat global de la dégustation
Quatre groupes de réponses possibles

Réponses	V_c-S_c	V_c-$S_{n.c}$	$V_{n.c}$-S_c	$V_{n.c}$-$S_{n.c}$
Produits				
1	15	—	—	5
2	14	—	—	6
3	19	—	1	—
4	20	—	—	—
5	15	2	—	3
6	14	—	1	5
7	14	2	—	4
8	14	—	—	6
9	14	1	—	5
10	13	—	—	7
11	12	—	—	8
12	18	—	1	1
13	13	—	1	6
14	17	—	1	1
Classes				
M	68	—	1	11
R	15	2	—	3
P	28	2	1	9
Q	14	—	—	6
S-P	27	1	—	12
S-C	60	—	3	16

Veau et Standard commercialisables (V_c — S_c)
Veau commercialisable, Standard non commercialisable (V_c — $S_{n.c}$.)
Veau non commercialisable, Standard commercialisable ($V_{n.c}$ — S_c.)
Aucun des deux produits n'est commercialisable ($V_{n.c}$ — $S_{n.c}$.)

En vue d'une différenciation V/S, le calcul de χ^2 est parfaitement inutile car l'ensemble des dégustateurs (à l'exception d'un nombre restreint de réponses réparties par moitié dans les deux colonnes du milieu) s'est distribué dans les deux groupes extrêmes :

— le veau et le standard sont commercialisables ;
— les 2 produits ne sont pas commercialisables.

CONCLUSIONS

Les auteurs ont voulu étudier les possibilités d'utilisation du veau congelé en remplacement total ou partiel d'une autre viande dans la fabrication de produits de charcuterie ; l'intérêt de cette expérience était double : meilleure valorisation des quartiers-avants de veau et fabrication de produits dont la qualité puisse répondre aux exigences du consommateur.

Le jury de dégustation a su différencier le produit à base de veau congelé du produit standard dans 70 p. 100 des cas (différence significative).

Par contre, il n'a pas manifesté de préférence significative pour l'un ou l'autre des produits. A noter une très légère préférence pour le standard dans les cas où une préférence *marquée* a été indiquée. Mais, quelle que soit cette préférence, le jury de dégustation a accordé la *même valeur marchande* au produit à base de veau et au produit témoin.

Aucune liaison entre, d'une part la préférence des dégustateurs et d'autre part la nature du produit, le type de préparation du produit, le mode de congélation et de conservation du veau et/ou le pourcentage de veau en remplacement d'une autre viande dans la préparation. La technologie particulière de chaque fabrication pourrait avoir une importance plus grande que la nature du produit lui-même sur les qualités organoleptiques du produit fini.

Ainsi, les qualités organoleptiques des produits fabriqués à base de veau congelé sont sensiblement comparables à celles des produits traditionnels, avec une coloration généralement plus claire ; les goûts du consommateur, les réticences du fabricant et la recherche de débouchés à la production paraissent conciliables.

Reçu pour publication en octobre 1969.

SUMMARY

ORGANOLEPTIC QUALITIES OF FROZEN VEAL IN THE PROCESSING AND CURING OF MEAT PRODUCTS

Because of distance from the source of supply and fluctuations in the price of the raw material, the meat industry tends more and more often to use frozen meat in its products.

The problem is to make the best use of this frozen meat, particularly the forequarters ; too often the economic aspect of this problem comes up against the psychology of either the manufacturer or the consumer.

The authors also wanted to study, from this point of view, the possibilities of using frozen veal as a total or partial replacement of other kinds of meat in the manufacture of this type of meat product.

The tasting jury was able to distinguish the product based on frozen veal from the standard product in 70 p. 100 of cases (a significant figure).

There was no marked preference for one type of product over the other. In the cases where some definite preference was expressed there was a slight leaning towards the standard product. However, in spite of this, the tasting jury accorded the same commercial value to the veal-based product as to the control product.

There was no connection between the consumer's preference, on the one hand, and, on the other, the nature of the product, the way it was prepared, the methods of freezing and storing,

the veal and/or the percentage of veal in the product in place of other meat. The particular technology used in each preparation might be of greater importance to the organoleptic qualities of the finished product than the nature of the product itself.

Thus the organoleptic qualities of manufactured foods made on a frozen veal basis are sufficiently comparable to those of the traditional product : in any case the outlook is now, generally speaking, a good deal clearer.

The consumer's tastes, the manufacturer's reserve and the search for markets for the produce appear to be reconcilable.

RESUMEN

CUALIDADES ORGANOLEPTICAS DE LA CARNE DE TERNERA CONGELADA EN LA FABRICACION DE PRODUCTOS DE CHARCUTERIA Y SALAZONES

Debido a la lejanía de las fuentes de aprovisionamiento y de la fluctuación de las cotizaciones de la materia prima, la industria cárnica tiende a utilizar cada vez con mayor frecuencia la carne congelada para sus fabricaciones.

El problema consiste en revalorizar del mejor modo posible esta carne congelada y, en particular, los cuartos delanteros. Ahora bien, el aspecto económico del problema tropieza muy frecuentemente con la sicología del transformador y del consumidor.

Teniendo presente semejantes perspectivas, los autores han deseado estudiar las posibilidades de utilización de la carne de ternera congelada, por sustitución total o parcial de otra carne en la fabricación de productos de charcuteria.

El jurado de degustación ha sabido establecer la diferencia entre el producto elaborado mediante ternera congelada y el producto clásico en un 70 p. 100 de casos (diferencia significativa).

No se ha señalado ninguna preferencia por uno u otro de los productos. Cabe ser indicada una diferencia muy ligera por el producto clásico, en caso de haberse puesto de manifiesto una preferencia por uno u otro de estos productos. Pero, sea cual sea esta preferencia, el jurado de degustación ha atribuido el mismo valor comercial al producto a base de ternera que al producto clásico.

Niàguna relación entre, en primer lugar, la preferencia de los degustadores y, en segundo lugar, el género de producto, el tipo de preparación del producto, la forma de congelación y de conservación de la ternera y/o el porcentaje de ternera en sustitución de otra carne en la preparación. La tecnología particular de cada fabricación podría, en cambio, tener una importancia mayor que el género de producto por sí mismo por lo que se refiere a las cualidades organolépticas del producto acabado.

Así, las cualidades organolépticas de los productos fabricados por medio de ternera congelada son comparables virtualmente con aquellas de los productos clásicos : no obstante el aspecto es generalmente más claro.

Los gustos del consumidor, la reticiencias del fabricante y la búsqueda de nuevas salidas para la producicón, parecen, pues, conciliables.

RIASSUNTO

QUALITA' ORGANOLETTICHE DELLA CARNEDI VITELLO CONGELATA NELLA FABRICAZIONE DI SALUMI E PRODOTTI SALATI

A cause dell'allontanamento delle fonti d'approvvigionamento e della fluttuazione dei corsi della materia prima, l'industria della carne tende a utilizzare la carne congelata per i suoi prodotti, con frequenza sempre crescente.

Il problema è di valorizzare nel miglior dei modi questa carne congelata e in particolare i tagli anteriori ; ora l'aspetto economico del problema trova troppo spesso un ostacolo nella psicologia del trasformatore e del consumatore.

Tenendo dunque conto di questa prospettiva, gli autori hanno voluto studiare le possibilità di impiegare la carne di vitello congelata per sostituire totalmente o parzialmente un'altra carne nella fabbricazione di salumi.

La giuria di degustazione ha saputo riconoscere il prodotto a base di carne di vitello congelata da quello tradizionale, nel 70 p. 100 dei casi (la percentuale è significativa).

Nessuna marcata preferenza per l'uno o l'altro dei prodotti. Nel caso in cui una preferenza è stata espressa, essa andava leggermente al prodotto classico. Ma qualunche sia stata questa preferenza, la giuria di degustazione ha attribuito lo stesso valore commerciale sia al prodotto a base di vitello che a quello standard.

Nessun rapporto tra la preferenza dei degustatori da una parte e d'altra parte la natura del prodotto, il tipo di preparazione del prodotto, il modo di congelazione e di conservazione della carne di vitello e, o, la percentuale di questa carne in sostituzione di un' altra nella preparazione. La tecnologia particolare ad ogni fabbricazione, potrebbe avere un'importanza più grande della natura del prodotto stesso, sulle qualità organolettiche del prodotto finito.

Quindi, le qualità organolettiche dei prodotti a base di carne di vitello congelata, sono sensibilmente paragonabili a quelle dei prodotti tradizionali ; tuttavia, l'aspetto è generalmente più chiaro.

I gusti del consumatore, le reticenze del fabbricante e la ricerca degli sbocchi per la produzione, sembrano conciliabili.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (4), 293-305.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES MÉTABOLISMES DE L'ACIDE MALIQUE EN VINIFICATION

VINIFICATIONS BEAUJOLAISES : OBSERVATIONS AU COURS DES CAMPAGNES 1962 A 1968

P. BRÉCHOT, J. CHAUVET, Madeleine CROSON et R. IRRMANN

Laboratoire des Fermentations, Institut Pasteur, 75 - Paris (15e)
Cuvage Chauvet Frères et Cie, 71 - La Chapelle-de-Guinchay

SOMMAIRE

Les auteurs présentent les observations qu'ils ont recueillies au cours de vinifications beaujolaises échelonnées sur 7 ans (1962-1968) dans le cuvage désigné ci-dessus.

Une étude de l'activité enzymatique des raisins, des levures et des bactéries a été faite ainsi qu'une étude de la place respective des fermentations éthylique et malolactique.

INTRODUCTION

Depuis une dizaine d'années, l'étude de la fermentation malolactique est un problème qui retient toute l'attention des œnologues microbiologistes. Le contrôle de cette fermentation, ou le déclenchement de celle-ci dirigé par le praticien, échappe encore à la technique œnologique, en dépit des efforts très importants qui ont été faits dans cette voie (LAFON-LAFOURCADE *et al.*, 1968).

On doit reconnaître que les œnologues ont tendance à étudier ce métabolisme bactérien lorsque la fermentation alcoolique est achevée. D'un autre côté, il est bien établi que les bactéries malolactiques se développent et métabolisent leur substrat dans un milieu qui leur est défavorable : taux d'alcool éthylique important, valeur du pH souvent basse, concentration relativement faible du milieu en protéines et acides aminés. Aussi, la composition initiale du moût, les conditions de la vinification, doivent être déterminantes pour l'incubation, l'invasion et l'activité de ces bactéries.

Ces considérations nous ont incité à ne pas dissocier l'étude de ces deux fermentations éthylique et lactique et à commencer un travail d'ensemble sur ce système bifermentaire.

Dans ce qui va suivre il sera fait état des observations que nous avons recueillies dans ce but au cours de vinifications beaujolaises échelonnées sur 7 années de 1962 à 1968 dans le cuvage désigné ci-dessus.

Ces observations ont porté sur :

1 : l'activité de l'enzyme malique des raisins ;
2 : l'activité de l'enzyme malique des levures ;
3 : l'activité respective des trois agents de dégradation de l'acide malique (raisins-levures-bactéries) ;
4 : la place respective des fermentations éthylique et malolactique au cours des vinifications.

Des résultats préliminaires concernant ces divers sujets ayant trait aux années 1962 et 1965 ont déjà été publiés ; afin de ne pas nuire à la cohésion de notre exposé nous reproduisons ces résultats, bien qu'ils puissent faire double emploi (CHAUVET *et al.*, 1963 ; BRÉCHOT *et al.*, 1966).

MÉTHODES ET TECHNIQUES

Au cours de nos essais, deux méthodes de vinification ont été utilisées : vinification beaujolaise traditionnelle et vinification par macération carbonique.

Nous rappelons que la vinification traditionnelle beaujolaise consiste à introduire dans la cuve la vendange entière, sans être foulée ni égrappée. La fermentation a lieu dans des cuves métalliques brauthitées de 40 hl.

Dans le cas de la vinification traditionnelle, on dispose sur l'orifice de chargement une toile métallique laquée maintenue dans un cadre de bois.

Lorsque l'on vinifie par macération carbonique, la vendange est introduite intacte dans la cuve métallique remplie au préalable de gaz carbonique. La cuve est saturée de gaz carbonique du début à la fin du remplissage, puis fermée ; l'orifice de chargement est alors obturé par un couvercle hermétique ; des bouchons de liège servent de soupape.

Ces deux modes de cuvaison se différencient par la présence initiale du gaz carbonique et une absence de tout contact possible avec l'air pendant la macération de la vendange.

Le séjour de la vendange dans la cuve pendant une dizaine de jours précédant le pressurage réalise dès le départ de la vinification des conditions favorables au développement des bactéries malolactiques.

Au cours des 7 années d'observations, toutes les opérations ont été faites sans sulfitage et sans chaptalisation avant le pressurage, quel que soit l'état de la vendange.

Les dosages des acides malique et lactique ont été effectués respectivement par la méthode de ROSSET et DUPUY (1958) et DIMOTAKI-KOURAKOU (1960).

Les dénominations des différents échantillons prélevés : *jus de tire ou jus de goutte, jus de presse, jus de goutte + presse* et *jus des lots raisins-témoins,* ainsi que les techniques de leur prélèvement, de conservation, ont été indiquées antérieurement (CHAUVET *et al.*, 1963).

Néanmoins au cours des deux dernières années, 1967 et 1968, les échantillons étaient conservés par simple congélation à — 30°C.

De plus, en 1968, l'acide malique a été dosé uniquement par voie enzymatique au moyen de la déshydrogénase de l'acide malique (BERGMEYER, 1963), préparée par des laboratoires commerciaux spécialisés.

Des essais préliminaires nous ont montré que cette méthode donne des résultats comparables à ceux fournis par la méthode ROSSET et DUPUY, employée antérieurement.

La dégradation malolactique a toujours été suivie au cours des vinifications par la technique classique de détection des acides fixes par la chromatographie de partage sur papier (RIBÉREAU-GAYON, 1954).

Pour ce qui est de la fermentation alcoolique, les techniques analytiques classiques ont été utilisées : densité, sucres réducteurs Fehling, acidités totale et volatile.

RÉSULTATS

1. *Activité de l'enzyme malique des raisins*

Le tableau 1 résume les résultats obtenus dans les jus de presse des cuvées soumises à la macération carbonique ; ce métabolisme strictement anaérobie de l'acide malique, bien que variable suivant les années, est très important : une dizaine de mmol/l d'acide malique disparaissent couramment par cet enzyme, ce qui représente une diminution de 20 à 30 p. 100 de l'acide total pour une teneur initiale en acide malique de 30 à 45 mmol/l.

On remarquera que les chiffres obtenus avec les jus des lots raisins-témoins (enfermés dans des sacs en matière plastique) et les jus de presse sont sensiblement comparables ; cette technique permet de mettre en évidence avec sûreté l'activité enzymatique malique du raisin, les grains restant intacts à l'intérieur du sac.

De plus, lorsque la fermentation malolactique est amorcée avant le pressurage, les jus de presse donnent des indications non interprétables, car les raisins baignent dans les jus de goutte soumis à cette fermentation ; dans ce cas, seuls les lots raisins-témoins donnent des renseignements significatifs.

En 1964, les raisins avaient une teneur en acide malique exceptionnellement faible : 13 à 17 mmol/l ; l'enzyme malique du raisin a fait disparaître 60 à 75 p. 100 de l'acide malique dans les jus de presse et 70 à 80 p. 100 dans les jus des lots-témoins.

Néanmoins, en 1967, cet enzyme paraît avoir été beaucoup moins actif, les quantités d'acide malique dégradé sont faibles ; il y a discordance entre les chiffres jus de presse et jus des lots raisins-témoins.

On remarquera que les temps de macération ont été en moyenne 10 à 12 jours, exceptionnellement 8 et 15 jours et les températures relativement basses, 19°C au début et 25°C en fin de macération.

En 1965, certaines macérations ont été faites en présence d'argon et d'azote ; l'enzyme malique du raisin semble avoir été légèrement moins actif en présence de ces deux gaz qu'en présence de gaz carbonique.

2. *Activité de l'enzyme malique des levures*

Cette activité levurienne ne peut être pratiquement mesurée qu'après le pressurage dans le liquide : *jus goutte + presse*. Le tableau 2 met en évidence ce métabolisme, on sait que celui-ci ne produit pas d'acide lactique, ce qui le différencie du métabolisme bactérien (Bréchot *et al.*, 1966). Les chiffres d'acide malique disparu et d'acide lactique apparu, mmol/l (col. 4 et 7), montrent cette dégradation qui précède la transformation malolactique bactérienne.

Cette dégradation est très variable et n'a pas la régularité de celle venant des raisins ; très souvent nulle, elle atteint parfois 30 p. 100 de l'acide malique total (col. 5) (1965, macération N_2 ; 1967, macération CO_2 et vinification traditionnelle) et ne paraît pas liée au mode de vinification.

Néanmoins lorsque ce métabolisme est peu intense (année 1965, trad. 1) il peut y avoir un doute sur son origine ; cependant le dosage enzymatique stéréospécifique

TABLEAU I

Activité de l'enzyme malique des raisins (macérations carboniques 1962 à 1968)

			Acide malique			Durée de la macération (jours)	Température de la macération (°C)
			Présent au temps 0 (mmol/l)	Disparu le jour du pressurage (presse)			
				(mmol/l)	(p. 100)		
1962	M. C. 1	Lot R. T.....	26,7	6	22,4	12	haut : 23-26
		Cuve	28,9	F. M. L. amorcée			bas : 20-25
	M. C. 2	Lot R. T.....	32,6	8,5	26	12	haut : 21-25
		Cuve	29,5	F. M. L. amorcée			bas : 18-23
1963	M. C. 1	Lot R. T.....	38,4	17,4	45,3	11	haut : 19-25
		Cuve	42,4	19,2	45,2		bas : 17-22
	M. C. 3	Lot R. T.....				13	haut : 16-19
		Cuve	49,1	25	50,9		bas : 16-18
1964	M. C. 1	Lot R. T.....	13,1	10,8	82,4	12	haut : 22-28
		Cuve	13,1	8,3	63,3		bas : 20-26
	M. C. 2	Lot R. T.....	17,5	12,4	70,8	15	haut : 20-25
		Cuve	17,1	13,0	76		bas : 18-20
1965	M. C. 1	Lot R. T.....	36,4	10,7	29,3	10	haut : 16-18
		Cuve	41,4	12,1	29,2		bas : 19-20
	M. N_2	Lot R. T.....	50	9,3	18,6	10	haut : 18-20
		Cuve	50	11,4	22,8		bas : 17-18
	M. Ar.	Lot R. T.... ..	46,1	8,6	18,6	9	haut : 17-18
		Cuve	46,1	9,3	20,1		bas : 17-18
1966	M. C. 1	Lot R. T.....	39,3	15,3	38,9	9	haut : 26-28
		Cuve	39,9	F. M. L. presque achevée			bas : 20-23
	M. C. 2	Lot R. T.....	32,8	9,7	29,5	9	haut : 21-23
		Cuve	29,6	F. M. L. en voie d'achèvement			bas : 23-28
1967	M. C. 1	Lot R. T.....	20,3	1,2	5,9	8	haut : 22-26
		Cuve	23,9	F. M. L. amorcée			bas : 17-22
	M. C. 2	Lot R. T	22,2	3,9	17,5	8	haut : 20-25
		Cuve	20,6	0,5	2,4		bas : 18-21
1968	M. C. 1	Lot R. T.....	57,8	16,1	27,8	10	haut : 18-23
		Cuve	51,9	18,4	35,4		bas : 16-21

Abréviations utilisées dans les tableaux 1, 2, 3 et la représentation graphique triangulaire :

M. C. = Macération dans le gaz carbonique
M. Ar. = Macération dans l'argon
M. N_2 = Macération dans l'azote
Trad. = Vinification traditionnelle
Lot R. T. = Lot Raisins-Témoins
F. M. L. = Fermentation malolactique.

de l'acide lactique pendant cette période lève cette indétermination : en effet l'acide lactique apparu est surtout l'acide *d* (—) ; l'expérience montre que ce dernier provient de la glycolyse levurienne (Bréchot *et al.*, 1966 ; Peynaud *et al.*, 1966).

TABLEAU 2

Part des raisins, des levures et des bactéries, en p. cent, dans la dégradation de l'acide malique

		Acide malique Temps 0 (mmol/l)	Acide malique disparu par voie non malolactique (Liquide : Goutte + Presse)				Ac. malique disparu par voie malolactique Bactéries (p. 100)	Ac. lactique apparu après pressurage avant F.M.L. Goutte + Presse (mmol/l)
			Jour du pressurage Raisins		Après pressurage Levures			
			(mmol/l)	(p. 100)	(mmol/l)	(p. 100)		
		1	2	3	4	5	6	7
1962	M. C. 1 ..	28,9	Indéterminable en raison du chevauchement des fermentations alcoolique et malolactique					
	M. C. 2 ..	29,5						
	Trad. 1 ..	23,5	4	17	3,8	16,2	66,8	0
	Trad. 2 ..	31,7	10,8	34	0	0	66	2
1963	M C. 1 ..	42,4	18,1	42,7	4,5	10,6	46,7	0,5
	M C. 3 ..	49,1	23,2	47,2	0	0	52,8	0,2
	Trad. 1 ..	40,6	20,3	50	0	0	50	0,2
	Trad. 2 ..	40,2	18,7	53,4	0	0	46,6	0
1964	M. C. 1 ..	13,1	Indéterminable en raison du chevauchement des fermentations alcoolique et malolactique					
	M. C. 2 ..	17,1						
	Trad. 2 ..	17,8						
1965	M. C. 1 ..	41,4	10,3	24,8	0	0	75,2	1,15
	M. Ar. ...	46,1	6,5	14	0	0	86	2,4
	M. N_2 ...	50	6,8	13,6	13,9	27,8	58,6	3,1
	Trad. 1 ..	47,8	13,9	29	2,5	5,2	65,8	2
1966	M. C. 1 ..	39,9	Indéterminable en raison du chevauchement des fermentations alcoolique et malolactique					
	M. C. 2 ..	29,6						
1967	M. C. 1 ..	23,9						
	M. C. 2 ..	20,6	0,5	2,4	7	33,9	63,7	0,95
	Trad. 1 ..	22,1	18,7	15,3	0	0	84,7	0
	Trad. 2 ..	20,3	5,2	25,6	6	29,5	44,9	2,35
1968	M. C. 1 ..	51,9	16,5	31,8	7,8	15	53,2	0 chromato.
	Trad. 1 ..	53,3	16	30	3,7	7	63	0 chromato.

3. *Activité respective des trois agents de dégradation de l'acide malique (raisins, levures et bactéries)*

Les colonnes 3, 5 et 6 du tableau 2 et la représentation graphique triangulaire (fig. 1) permettent d'apprécier quantitativement le rôle de ces trois agents de dégradation.

La part des raisins a été calculée en déterminant l'acide malique disparu dans

le liquide *goutte + presse* le jour même du pressurage (ex. : 1963, M. C. I., col. 2 : 18,1 mmol/l) ; le pourcentage d'acide malique ainsi disparu est évalué en tenant compte de l'acide malique initial (col. 1 : 42,4 mmol/l) soit : $\frac{18,1}{42,4} \times 100 = 42,7$ (col. 3).

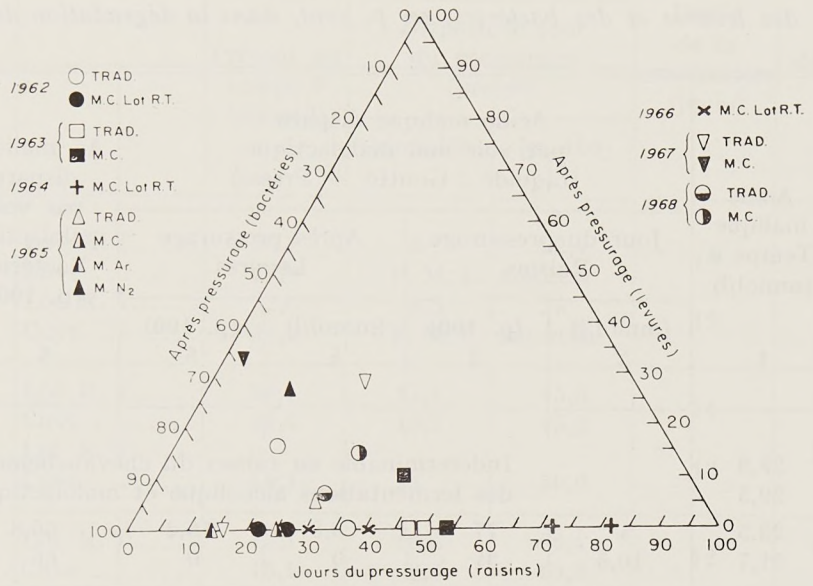


FIG. 1. — *Part des raisins, des levures et des bactéries, en p. 100, dans la dégradation de l'acide malique*

Ces chiffres peuvent être légèrement différents de ceux du tableau 1 qui ne concernaient que les jus de presse ; le *démaliquage* des *jus de goutte* peut ne pas être le même que celui des *jus de presse*.

On a ainsi une valeur minimale de la part des raisins dans la disparition de l'acide malique, tandis qu'avec les jus des lots raisins-témoins et jus de presse, on a une limite supérieure de cette activité.

Le rôle des levures apparaît dans les colonnes 4 et 5 et a été calculé à partir de l'acide malique dégradé par l'enzyme malique des levures ; la part en p. 100 s'évalue comme dans les cas de la part des raisins.

En faisant la somme des pourcentages attribués aux raisins et aux levures (ex. : 1962, Trad. 1, 17 + 16,2 = 33,2), on obtient par différence la part des bactéries (100 — 33,2 = 66,8). Leur rôle est généralement primordial, comme le montre la figure 1 ; la plupart des points figuratifs se trouvent dans la zone du triangle où la part des bactéries est supérieure à 50 p. 100.

Cependant dans certains cas, raisins et levures ont la parité avec les bactéries ; même en 1964 (tabl. 1) les bactéries n'ont qu'une faible part dans ce métabolisme.

4. *Place respective des fermentations alcoolique et malolactique au cours de la vinification*

Le tableau 3 montre que deux places sont possibles :

1. Les deux fermentations sont chevauchantes (années 1962-63-66 et 67), la fermentation lactique est même déclenchée avant le pressurage ;

2. Les deux fermentations sont décalées, suivant un laps de temps plus ou moins long (années 1967-68).

On doit remarquer que ces deux possibilités peuvent se présenter la même année.

TABLEAU 3

Place respective des fermentations alcoolique et malolactique au cours de la vinification

	Caractéristiques météorologiques de l'année		Place respective, suivant les jours de vinification, des fermentations				
	Pluies en mm Hauteur observée (1)	Température moyenne observée °C (2)		Alcoolique		Malolactique	
				Pressurage	Fin	Début	Fin
1962							
Juillet	39,5	19	M. C. 1	12e	15e	*av. pres.*	ap. 23e
Août	46,2	20,9	M. C. 2	12e	14e	*av. pres.*	ap. 22e
Septembre	95,1	15,8	Trad. 1	4e	9e	après 2 mois	
Hauteur totale	180,8		Trad. 2	7e	9e	17e	non déter.
p. 100 de la normale..	*92,2*						
1963							
Juillet	63,8	20,5	M. C. 1	12e	20e	*16e*	24e
Août	174,8	17,9	M. C. 3	13e	18e	non déclenchée	24e
Septembre	32,8	15,8	Trad. 1	10e	17e	17e	21e
Hauteur totale	271,4		Trad. 2	11e	17e	11e	ap. 24e
p. 100 de la normale..	*138,4*						
1964							
Juillet	38,4	21,9	M. C. 1	12e	14e	*av. pres.*	20e
Août	57,4	19,6	M. C. 2	15	27e	*av. pres.*	23e
Septembre	60,1	17	Trad. 1	8e	12e	non déclenchée	27e
Hauteur totale	155,9		Trad. 2	15e	20e	*av. press.*	ap. 27e
p. 100 de la normale..	*79,5*						
1965							
Juillet	138,4	18	M. C. 1	10e	15e	non déclenchée	23e
Août	69,5	18,4	M. Ar.	9e	12e	—	
Septembre	196,8	13,8	M. N_2	10e	14e	—	
Hauteur totale	404,7		Trad. 1	8e	12e	—	
p. 100 de la normale..	*206,4*						

	Juillet	Août	Septembre	Total
(1) Pluies en mm., hauteur normale :	64	67	65	196
(2) Température normale :	20°C	19,5°C	16,3°C	

TABLEAU 3 *(suite)*

	Caractéristiques météorologiques de l'année		Place respective, suivant les jours de vinification, des fermentations				
				Alcoolique		Malolactique	
	Pluies en mm. Hauteur observée (1)	Température moyenne observée °C (2)		Pressurage	Fin	Début	Fin
1966							
Juillet	42,7	17,8	M. C. 1	9e	14e	5e	15e
Août	55,9	18,1	M. C. 2	6e	12e	6e	14e
Septembre	55,8	17,1					
Hauteur totale	154,4						
p. 100 de la normale..	*78,7*						
1967							
Juillet	35,7	21,5	M. C. 1	9e	12e	*av. pres.*	17e
Août	88,1	19,3	M. C. 2	8e	11e	non déclenchée	20e
Septembre	93,7	15,1	Trad. 1	6e	9e	*6e*	18e
Hauteur totale	217,5		Trad. 2	7e	9e	non déclenchée	20e
p. 100 de la normale..	*110,9*						
1968							
Juillet	67	19,4	M. C. 1	10e	14e	17e	26e
Août	190	17,5	Trad. 1	5e	10e	18e	23e
Septembre	106	15					
Hauteur totale	363						
p. 100 de la normale..	*185,2*						

	Juillet	Août	Septembre	Total
(1) Pluies en mm., hauteur normale :	64	67	65	196
(2) Température normale :	20°C	19,5°C	16,3°C	

DISCUSSION

La méthode beaujolaise évite le foulage des raisins, permet une macération relativement longue de la vendange et offre ainsi la possibilité de supprimer tout sulfitage initial. Toutefois en cas de pourriture les vins obtenus sont cassants lorsque la couverture carbonique a disparu : une addition judicieuse d'anhydride sulfureux et d'acide ascorbique est alors nécessaire.

Cette méthode réalise des conditions optimales pour le déclenchement rapide de la fermentation malolactique naturelle. En effet, l'absence de foulage et de sulfitage, la macération relativement longue de la vendange, permettent à chacun des agents de transformation de l'acide malique, raisins, levures, bactéries, d'utiliser au mieux leur potentiel enzymatique.

Au colloque d'Œnologie de l'I. T. V., tenu à Mâcon en 1958, M. FLANZY a posé le problème de ce métabolisme tripartite de l'acide malique ; nous pensons avoir apporté ici une contribution expérimentale à la détermination numérique de cette dégradation fractionnée.

Si, comme nous l'avons déjà dit, le contrôle de la fermentation malolactique échappe encore à l'œnologue, il en est encore de même pour celui des enzymes maliques des raisins et des levures.

Les renseignements que nous avons sur ces deux systèmes (BRÉCHOT *et al.*, 1966) sont encore incomplets. Pour ce qui est du rôle des raisins, le devenir complet de l'acide malique n'a pas encore été élucidé (FLANZY *et al.*, 1967) ; néanmoins le marquage de l'acide malique synthétisé à partir de $^{14}CO_2$ par des baies de raisin en anaérobiose gazeuse (FLANZY *et al.*, 1968) ouvre la voie de l'étude de ce devenir : l'acide malique ainsi formé pourrait être suivi au cours de la macération dans ses produits métabolisés, qu'il s'agisse de réactions de dégradation ou de synthèse.

D'un autre côté, des auteurs japonais (OTSUKA *et al.*, 1964) ont montré la chute de l'acide malique et l'enrichissement en acide lactique des grains de raisin stockés à 40°C.

Dans nos essais, aucun enrichissement en acide lactique n'a été constaté. Il serait intéressant de préciser si la température est un facteur qui intervient pour déterminer la nature de la réaction à laquelle l'acide malique est soumis.

Quant au métabolisme malique levurien, nous n'avons aucune indication sur son déclenchement ; est-il la conséquence d'une induction enzymatique substrat-enzyme à l'instar de l'enzyme malique bactérien (KORKES *et al.*, 1950) ou d'une induction perméasique? Ce sont des questions auxquelles aucune réponse ne peut encore être apportée, faute de données expérimentales.

Enfin les places respectives des deux fermentations alcoolique et lactique, variables suivant les années, n'ont pas encore également trouvé leur explication.

Parmi les conditions favorisantes de la vinification, l'atmosphère initiale de gaz carbonique de la macération carbonique semble intervenir dans ce sens ; sur 26 vinifications suivies au cours de ces années, 14 d'entre elles présentent les deux fermentations chevauchantes dont 8 sont des macérations carboniques et 6 des cuvaisons traditionnelles. Le travail récent de FLANZY *et al.* (1968), en montrant une possibilité de synthèse d'acide aminé à partir du gaz carbonique, pourrait donner une explication de cette action favorisante ; la pénurie en acides aminés du milieu serait ainsi partiellement abolie, ce qui serait profitable aux bactéries.

D'un autre côté on peut prendre en considération certaines caractéristiques météorologiques de l'année étudiée, hauteurs des pluies et température moyenne observées pendant les mois de maturation (juillet, août, septembre).

D'après le tableau 3, la pluviométrie de la période de maturation semble intervenir ; à chaque fois qu'il y a chevauchement des deux fermentations pour une même campagne, la pluviométrie est déficitaire ou sensiblement normale.

En 1962 : pluviométrie du 3e trimestre : 92 p. 100 de la pluviométrie normale.
En 1964 : pluviométrie du 3e trimestre : 79,5 p. 100 de la pluviométrie normale.
En 1966 : pluviométrie du 3e trimestre : 78,6 p. 100 de la pluviométrie normale.
En 1967 : pluviométrie du 3e trimestre : 110,9 p. 100 de la pluviométrie normale.

Lorsque la hauteur d'eau a été importante (1965 : 206,4 p. 100 de la normale,

1968 : 185,2 p. 100), la dégradation bactérienne s'est faite après un décalage plus ou moins long ; le chauffage du cuvage à 24-25°C, ainsi que le remontage à l'abri de l'air avaient été nécessaires pour assurer le développement des bactéries.

La pluviométrie et la température déterminent l'état de maturation de la vendange ainsi que son état sanitaire ; il y a là, pour le déclenchement de la fermentation malolactique, des conditions qu'il faudrait préciser : teneur des moûts en N protéique et aminé, substances antibiotiques élaborées au cours de la pourriture (LAFOURCADE, 1955), richesse et composition de la microflore bactérienne, autant d'hypothèses de travail pour de prochains essais.

Il est remarquable de constater que, en cas de chevauchement des 2 fermentations, les vins ont été élaborés sans acidité volatile (teneur inférieure à 0,2 g. SO_4H_2/l ce qui est la preuve indirecte d'un démaliquage homolactique en présence de sucre.

Si cette observation, pluviométrie et place respective des deux fermentations, se vérifiait ultérieurement, on aurait un moyen simple pour mettre en garde le praticien contre toute chaptalisation excessive en cas d'année sèche, susceptible d'entraîner l'accident acétolactique classique.

Enfin nous sommes encore sans renseignement sur la compétition possible entre les deux systèmes *glycolytique* et *malicolytique* appartenant à chacun des agents de dégradation : raisins, levures, bactéries. Néanmoins des publications récentes (LONDON *et al.*, 1969 ; PEYNAUD, 1968) permettent des hypothèses de travail qui, extrapolées avec prudence, pourraient se révéler fécondes. De même la dégradation hétérolactique par la voie des pentoses-phosphates dont les liaisons —O ~ P sont riches en énergie, mériterait d'être prise en considération (HEATH *et al.*, 1958). A partir de ces données, il y a peut-être à montrer une régulation enzymatique capable d'expliquer un mécanisme qui depuis longtemps laisse l'œnologue perplexe.

CONCLUSIONS

Ces diverses observations ont montré que la méthode beaujolaise de vinification (avec sa variante la macération carbonique) permet l'utilisation d'un triple système enzymatique métabolisant l'acide malique. Cette potentialité enzymatique appartient, suivant leur ordre d'importance, aux bactéries, raisins et levures.

Si l'on proscrit, avant pressurage, foulage, sulfitage, chaptalisation, et si les cuvaisons sont relativement longues (10 à 15 jours), à des températures voisines de 20 à 25°C, en anaérobiose complète, on assiste à une élaboration finale du produit qui donne toute satisfaction. Le démaliquage, en cours de vinification, nous paraît être actuellement la seule voie sûre, étant donné que le contrôle de la fermentation malolactique sur vins faits n'est réalisable que dans des conditions généralement hors de portée dans la pratique courante.

Dans la discussion des résultats obtenus, ont été indiqués les progrès que doivent réaliser nos connaissances relatives :

1° au métabolisme conjugué du glucose et de l'acide malique provoqué par les raisins, les levures et les bactéries ; pour ces dernières l'étude des pentoses est également à ne pas perdre de vue ;

2° à l'influence du gaz carbonique sur la biologie des bactéries malolactiques ;

3° à l'écologie de ces bactéries, compte tenu des conditions météorologiques au cours de la maturation, de la composition des moûts (richesse en N protéique et aminé).

Reçu pour publication en juillet 1969.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une subvention de l'Institut technique du Vin, 2, rue de Rigny, Paris (8e), auquel nous adressons nos remerciements.

Nous remercions M. Rivoire, Directeur du Laboratoire de Chimie agricole de Mâcon, qui a bien voulu nous transmettre les caractéristiques météorologiques des diverses campagnes, d'après les relevés de la Station météorologique des Bruyères, à Charnay-lès-Mâcon. Le Laboratoire de Chimie agricole de Mâcon a, également, bien voulu se charger en 1968 du dosage enzymatique de l'acide malique.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF MALIC ACID METABOLISMS IN VINIFICATION. BEAUJOLAIS VINIFICATIONS, OBSERVATIONS DURING SEVEN YEARS (1962-1968)

1. Observations made during the Beaujolais vinification (both traditional vinification and vinification by carbonic maceration spread over 7 years (1962-1968) show that malic acid was metabolized by breakdown agents : grapes, yeasts and bacteria.

Experimental work has been done to determine numerically how much each of these three agents contributes to the eventual breakdown.

2. The respective positions of alcoholic and malolactic fermentation have been studied in relation to certain data connected with the year's weather. When the rainfall was below average or fairly normal during the grape-ripening period the two fermentations overlapped ; conversely, when the rainfall was higher than normal the two fermentations took place separately, as is considered the general rule, the malolactic fermentation following the alcoholic fermentation after a variable interval.

3. In discussing the results, the authors point out that further knowledge should be sought regarding :

a) the metabolic competition between « oses » (hexoses and pentoses) and malic acid, and whether it is a matter of grapes yeast or bacterial enzymes ;

b) the effect of carbon dioxide on the biology of malolactic bacteria ;

c) the ecology of these bacteria, taking into account the meteorological conditions during the ripening period, and the composition of the musts (content of proteic and amino nitrogen).

RESUMEN

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS METABOLISMOS DEL ÁCIDO MÁLICO EN VINIFICACIÓN. VINIFICACIONES BEAUJOLAISES : OBSERVACIONES DURANTE EL TRANSCURSO DE LAS CAMPAÑAS 1962 A 1968

1. Las observaciones efectuadas durante el transcurso de vinificaciones beaujolaises (vinificaciones clásicas y vinificaciones por maceración carbónica) escalonadas durante siete años (1962 a 1968) han demostrado que el ácido málico quedaba metabolizado por tres agentes de degradación : uvas, levaduras y bacterías.

Ha sido aportada una contribución experimental en la determinación numérica de esta degradación fraccionada.

2. El lugar respectivo de las fermentaciones alcohólica y maloláctica ha sido estudiado en función de ciertos datos del año climático : cuando la pluviometría es deficitaria o approximadamente normal durante el periodo de maduración de las uvas, las dos fermentaciones se superponen una a otra ; por el contrario, cuando la pluviometría es superior a la normal, las dos fermentaciones tienen lugar en momentos diferentes y, como es costumbre comprobarlo, la fermentación maloláctica viene a continuación, con un intervalo de tiempo variable, de la fermentación alcohólica.

3. En la discusión de los resultados, los autores indican los progresos que deben realizarse en cuanto a nuestros conocimientos relativos :

a) a la competición metabólica entre las osas (hexosas y pentosas) y el ácido málico, ya se trate de sistemas enzimáticos de la uva, de las levaduras o de las bacterías.

b) a la influencia del gas carbónico sobre la biología de las bacterías malolàcticas.

c) a la ecología de estas bacterias, cuenta habida de las condiciones meteorológicas durante el transcurso de la maduración y de la composición de los mostos (riquezas en N proteico y aminado).

RIASSUNTO

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DEI METABOLISMI DELL'ACIDO MALICO IN VINIFICAZIONE. VINIFICAZIONI BEAUJOLAISES : OSSERVAZIONI NEL CORSO DELLE CAMPAGNE 1962 A 1968

1. Le osservazioni raccolte nel corso di vinificazioni beaujolaises (vinificazioni tradizionali e vinificazioni con macerazione carbonica) scaglionate su 7 annate (1962 a 1968) hanno mostrato che l'acido malico era metabolizzato da 3 agenti di degradazione : uve, lieviti e batterie.

Un contributo sperimentale e stato apportato alla determinazione numerica di questa degradazione frazionata.

2. Il posto rispettivo delle fermentazioni alcooliche e malolattiche è stato studiato in funzione di certi dati dell'anno climatico : quando la pluviometria è deficitaria o sensibilmente normale durante il periodo di maturazione delle uve, le due fermentazioni si accavallano ; al contrario quando la pluviometria è superiore alla normale, le due fermentazioni sono decalate, come è classico di constatarlo, la fermentazione malolattica segue, con un intervallo di tempo variabile, la fermentazione alcoolica.

3. Nella discussione dei risultati gli autori indicano i progressi che devono realizzare le nostre conoscenze relative :

a) alla competizione metabolica tra le ose (esose e pentose) e l'acido malico che si tratti dei sistemi enzimatici delle uve, dei lieviti, delle batterie ;

b) all'influenza del gas carbonico sulla biologia delle batterie malolattiche ;

c) all'ecologia di queste batterie, tenuto conto delle condizioni meteorologiche, nel corso della maturazione, della composizione dei mosti (ricchezze in N proteico ed aminato).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERGMEYER H. U., 1963. *Methods of enzymatic analysis*, 328-332, Acad. Press, New York and London.

BRÉCHOT P., CHAUVET J., CROSON M., IRRMANN R., 1966. Disparition de l'acide malique pendant la vinification de vendanges entières en Beaujolais (année 1965) : rôle du raisin, des levures et des bactéries. *C. R. Acad. Agric. Fr.* **52**, 582-587.

BRÉCHOT P., CHAUVET J., CROSON M., IRRMANN R., 1966. Configuration optique de l'acide lactique apparu au cours de la fermentation malolactique pendant la vinification. *C. R. Acad. Sci.*, **262**, 1605-1607.

CHAUVET J., BRÉCHOT P., DUPUY P., CROSON M., IRRMANN R., 1963. Évolution des acides malique et lactique dans la vinification par macération carbonique de la vendange. *Ann. Technol. agric.* **12**, 237-246.

DIMOTAKI-KOURAKOU V., 1960. Dosage de l'acide lactique dans les vins à l'aide d'échangeurs d'ions. *Ann. Falsif. Expert. chim.*, **53**, 569-580.

FLANZY C., ANDRÉ P., FLANZY M., CHAMBROY Y., 1967. Variations quantitatives des acides organiques stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. I. Influence de la température. II. Influence de la durée d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 27-34 et 89-107.

FLANZY C., FLANZY M., ANDRÉ P., CHAMBROY Y., 1968. Fixation à l'obscurité du $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin en anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 287-297.

HEATH E. C., HURWITZ J., HORECKER B. L., GINSBURG A., 1958. Pentose fermentation by *Lactobacillus plantarum*. I. The cleavage of xylulose-5-phosphate by phosphoketolase. *J. biol. Chem.*, **231**, 1009-1029 et E. C. HEATH, B. L. HORECKER, P. Z. SMYRNIOTIS, et Y. TAKAJI, 1958. Pentose fermentation by *Lactobacillus plantarum*. II. L-Arabinose isomerase. *Ibid.*, 1031-1037.

KORKES S., CAMPILLO, OCHOA S., 1950. Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. IV. Isolation and properties of an adaptative « malic » enzyme from *Lactobacillus arabinosus*. *J. biol. Chem.*, **187**, 891-90.

LAFOURCADE S., 1955. *Contribution à l'étude des activateurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisin.* Thèse Ing. Docteur, Bordeaux.

LAFON-LAFOURCADE S., DOMERCQ S., PEYNAUD E., 1968. Étude de l'ensemencement des vins par les bactéries de la fermentation malolactique. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, France, **2**, 83-97 (voir références bibliographiques des travaux français et étrangers cités).

LONDON J., MEYER E. Y., 1969. Malate utilization by a group D *Streptococcus*. II. Evidence for allosteric inhibition of an inducible malate dehydrogenase (decarboxylating) by ATP and glycolytic intermediate products. *Biochim. biophys. Acta*, **178**, 205-212.

OTSUKA K., IMAI S., AIBA K., 1964. Studies on storage of harvested grapes for wine making. *Agric. biol. Chem.*, **28**, 375-381.

PEYNAUD E., LAFON-LAFOURCADE S., GUIMBERTEAU G., 1966. L(+) lactic acid and D (—) lactic acid in wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **17**, nº 4, 302-307.

PEYNAUD E., 1968. Mécanisme biochimique de la fermentation malolactique. *C. R. Acad. Sci.*, **267**, 121-122.

RIBÉREAU-GAYON P., 1954. Évaluation de l'acide malique des vins par chromatographie sur papier. *Ann. Falsif. Fraudes*, **47**, 3-9.

ROSSET R., DUPUY P., 1958. Détermination de l'acide *l*-malique dans les boissons fermentées par décarboxylation enzymatique. *Ann. Technol. agric.*, 441-451.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (4), 307-325.

FIXATION A L'OBSCURITÉ DU $^{14}CO_2$ GAZEUX PAR DES BAIES DE RAISIN EN ANAÉROBIOSE

II. — Devenir du ^{14}C au cours de la fermentation intracellulaire

C. FLANZY, M. FLANZY, P. ANDRÉ et Y. CHAMBROY
avec la collaboration technique de Geneviève Migliori et M. Tacchini

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, 84 - Montfavet
Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Des baies de raisin, variété *Aledo*, mûres et saines, sont placées dans des enceintes dont l'atmosphère, formée de 99 p. 100 d'argon, est ensuite enrichie par du $^{14}CO_2$. Les baies sont laissées en présence du $^{14}CO_2$ pendant cinq heures, à 35°C, à l'obscurité. Passé ce délai, un lot de baies est analysé. Les baies d'un deuxième lot sont replacées en atmosphère d'argon, après suppression de la source radioactive, et sont analysées au bout de 6 jours d'anaérobiose.

La distribution du ^{14}C est recherchée dans différents substrats isolés du moût, de la pulpe et des pépins. La radioactivité est retrouvée principalement dans les acides organiques du cycle de Krebs et les acides aminés libres. D'autres composés apparaissent également marqués : acides shikimique et quinique, éthanol, sucres réducteurs, protéines.

Les incorporations respectives dans le moût, la pulpe, les pépins sont comparées et discutées.

INTRODUCTION

Dans une note précédente (Flanzy *et al.*, 1968), nous avons mis en évidence une incorporation de CO_2, en anaérobiose, dans les substrats du raisin. De manière à préciser le devenir du carbone du CO_2 au cours de la fermentation intracellulaire, nous avons apporté du $^{14}CO_2$ gazeux à des baies placées à l'obscurité, à 35°C, en atmo-

Abréviations : ipm impulsion par minute.
RT radioactivité totale exprimée en impulsions par minute.
RS radioactivité spécifique exprimée en impulsions par minute par micromole.

sphère d'argon (anaérobiose) et nous avons recherché la distribution du ^{14}C dans les métabolites isolés du moût, de la pulpe et des pépins. Aussitôt après la fin de la fixation de $^{14}CO_2$ effectuée pendant 5 heures, un lot de baies est analysé, alors qu'un autre lot est replacé en atmosphère d'argon, à l'obscurité. Les différentes déterminations analytiques sont réalisées sur ce deuxième lot après 6 jours d'anaérobiose.

MÉTHODES ET TECHNIQUES

1. *Préparation du matériel végétal*

Des raisins blancs (10 kg ; moût pH = 3,9 ; 190 g/l de sucres réducteurs), variété *Aledo*, en provenance du commerce, sont sélectionnés d'après les critères de maturité apparente et de bon état sanitaire. Chaque grappe donne un ensemble de grains séparés du pédicelle au ras du bourrelet. Seules, les baies présentant un volume moyen sont retenues. La répartition se fait en 18 lots, selon un processus où un ensemble de grains est distribué d'une façon cyclique à raison d'une baie par lot et par cycle. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'échantillons de 65 baies (255 ± 1 g).

2. *Incorporation de $^{14}CO_2$ gazeux*

Les fixations de $^{14}CO_2$ sont réalisées, séparément, par deux lots (A et B) de 65 baies chacun, durant 5 heures. Les essais sont conduits en chambre noire, thermostatée à 35°C (fig. 1). Chaque lot, représentant un volume de 235 ml, est placé dans un récipient clos de 550 ml (Flanzy *et al.*, 1968). Ce récipient contient d'autre part un bécher dans lequel sont versés 5 ml de solution aqueuse de $Na_2{}^{14}CO_3$ (RT = 500 µCi ; RS = 37,9 mCi/mM soit 1,4 mg de $Na_2{}^{14}CO_3$ correspondant à 0,30 ml de $^{14}CO_2$). L'air de l'enceinte est remplacé par de l'argon en utilisant la technique décrite précédemment (Flanzy *et al.*, 1968).

Le $^{14}CO_2$ gazeux est libéré à partir de $Na_2{}^{14}CO_3$, par addition d'un ml du mélange $HClO_4$ - H_2O (1/1 en volume). La concentration du $^{14}CO_2$ dans l'atmosphère de l'enceinte avoisine 1 p. 1 000.

Après avoir laissé les baies pendant 5 heures en présence du $^{14}CO_2$, l'enceinte est soumise à un balayage par de l'argon durant 15 minutes. Le $^{14}CO_2$ résiduel, ainsi chassé, est recueilli dans deux barboteurs placés en série et contenant chacun 5 ml de solution éthanolique de soude 5 N.

Les baies du lot A sont alors prélevées pour analyses (fig. 1).

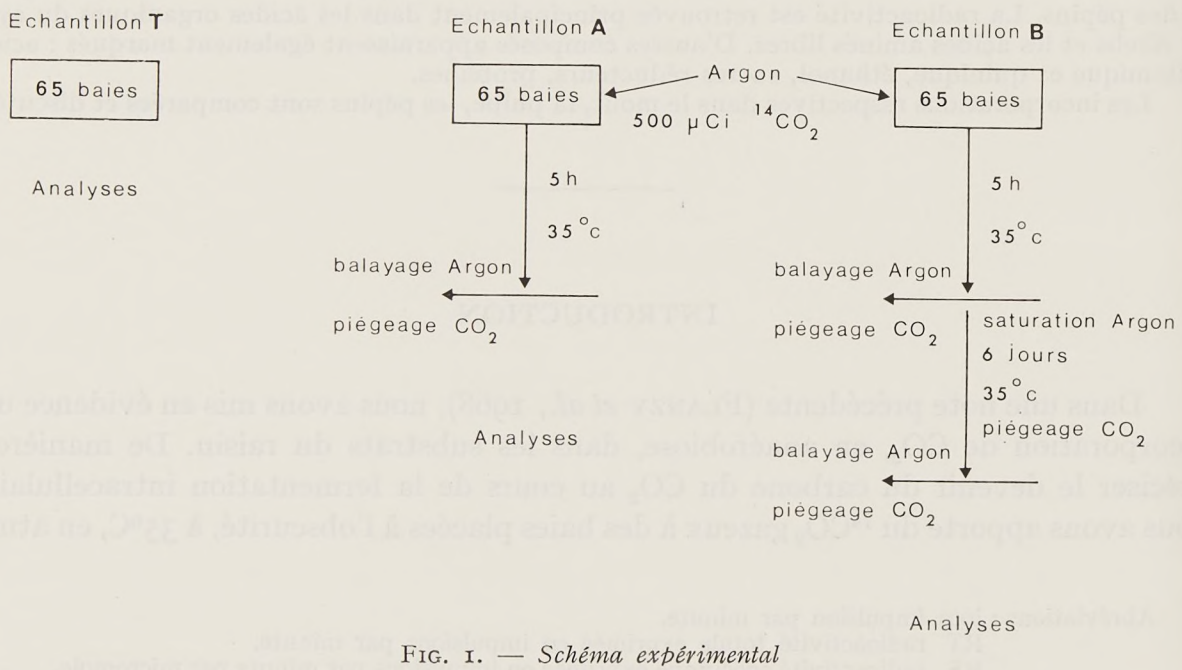


Fig. 1. — *Schéma expérimental*

Après suppression de sa source radioactive, l'enceinte du lot B est, à nouveau, saturée d'argon. Les gaz formés durant les six jours suivants peuvent s'échapper en continu de l'enceinte et sont recueillis dans deux pièges à soude éthanolique. Ces pièges sont renouvelés chaque jour.

A la fin du 6e jour d'expérience et après un balayage de l'enceinte par de l'argon, les baies de ce deuxième lot sont prélevées à leur tour pour analyses.

3. *Fixation et extraction des différents métabolites*

Les baies sont pressurées à la température de la glace fondante. Le jus obtenu (140 ml) est centrifugé 5 minutes à 1 500 *g*. Le surnageant constitue la fraction « Moût ». L'ensemble culot de centrifugation et résidu obtenu au pressurage forme la fraction « marc » (87 ± 2 g), elle-même subdivisée ultérieurement en « pulpe » et « pépins ».

Les analyses sur le moût sont réalisées de la manière suivante : 50 ml de moût, stabilisés par l'éthanol bouillant, servent au dosage des acides organiques non cétoniques, des acides aminés libres et des substances neutres. Une partie aliquote de 10 ml de moût, mélangée à une solution de 2-4 dinitrophényl-hydrazine 5 p. 1 000 dans $HClO_4$ 2 N, est utilisée pour isoler les 2-4 dinitrophénylhydrazones des acides cétoniques. La teneur en alcool éthylique du moût est déterminée sur une troisième partie aliquote (50 ml) conservée à — 25°C (fig. 2).

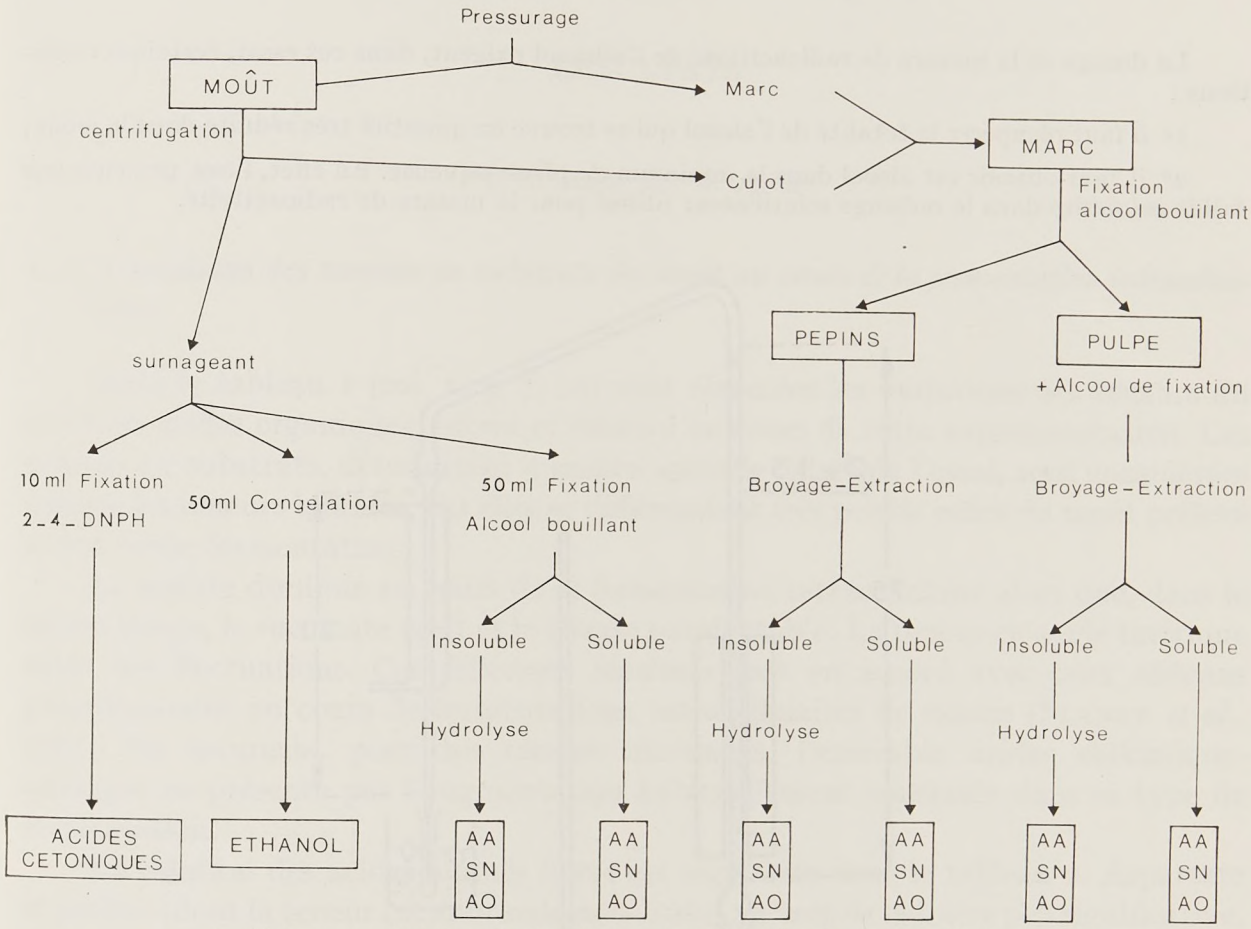


FIG. 2. — *Schéma d'extraction et de séparation des métabolites*

AA : acides aminés
AO : acides organiques
SN : substances neutres

Le marc est fixé par l'alcool bouillant. Puis, après séparation des pépins et de la pulpe (formée de la pellicule, des structures cellulaires et du moût non extrait au pressurage, auxquels on ajoute l'alcool de fixation), les acides organiques non cétoniques et les acides aminés libres sont dosés dans chacune de ces fractions après broyage de celles-ci.

Les résidus insolubles, obtenus après extractions alcooliques et aqueuses du matériel fixé à l'alcool bouillant, sont hydrolysés (HCl 6 N — 24 H/110°C). Après évaporation de l'HCl, les

extraits dans les ballons sont repris par l'éthanol et les acides aminés libérés sont alors dosés (fig. 2).

Les extraits hydroalcooliques obtenus à partir du moût, de la pulpe et des pépins, ainsi que la solution alcoolique obtenue après hydrolyse, sont passés à 4°C sur colonnes de Permutite 50 forme H^+ qui retiennent les acides aminés. Les effluents contiennent les substances neutres et les acides organiques. Ceux-ci sont ensuite fixés sur les colonnes échangeuses d'anions : Dowex 1 forme $HCOO^-$ ou IRA 400 forme $CO_3^=$.

4. *Analyse des acides aminés, acides organiques, sucres, acides cétoniques ; mesures de leur radioactivité*

Toutes les déterminations relatives à ces substances sont conduites selon les techniques décrites précédemment (Flanzy *et al.*, 1968).

La précision des mesures de RS est de 40 p. 100 (Jolivet, 1969).

5. *Séparation et dosage de l'alcool éthylique*

Le dosage et la mesure de radioactivité de l'éthanol exigent, dans cet essai, certaines conditions :

1° il faut récupérer la totalité de l'alcool qui se trouve en quantité très réduite dans le moût ;

2° il faut obtenir cet alcool dans le minimum de phase aqueuse. En effet, l'eau présente une faible solubilité dans le mélange scintillateur utilisé pour la mesure de radioactivité.

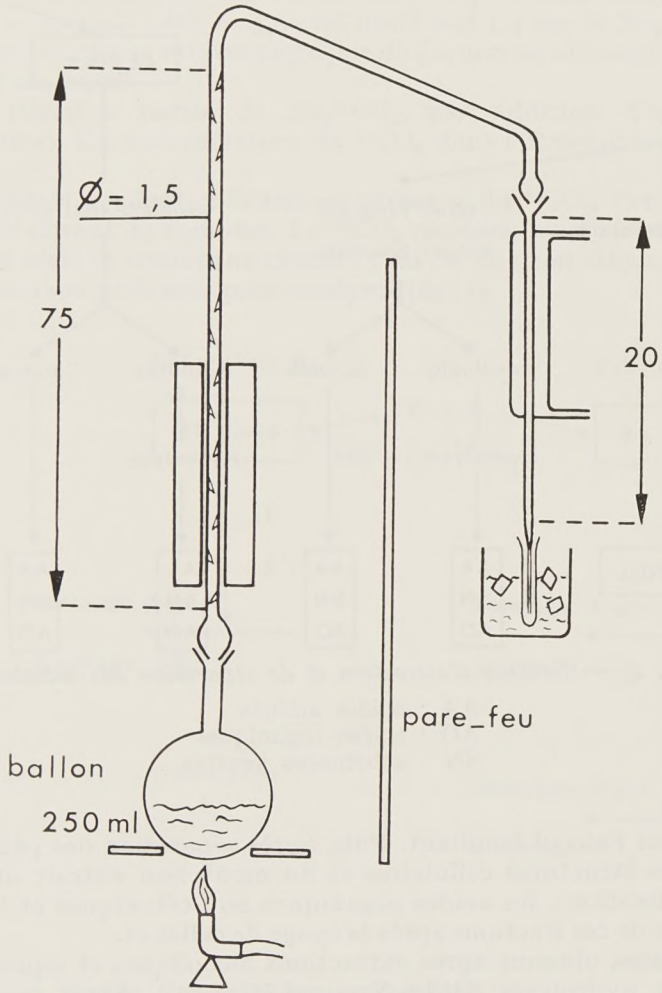


Fig. 3. — *Appareillage destiné à la distillation-rectification de l'éthanol*

Ces conditions sont remplies en procédant à une distillation-rectification de l'alcool éthylique au moyen d'un appareillage préconisé par JAULMES (1968) selon une technique dérivée de celle de KOHN-ABREST et TRUFFERT (1948) (fig. 3).

Les 50 ml de surnageant, décongelés, sont placés dans un ballon à distillation de 250 ml avec quelques grains de pierre ponce. Une colonne rectificatrice (à nombreuses pointes de Vigreux) de 75 cm de long et 1,5 centimètre de diamètre, surmonte le ballon. La colonne partiellement calorifugée est reliée à un tube descendant muni d'un réfrigérant. L'extrémité du tube, effilée en pointe, plonge dans le fond d'un récipient étroit, contenant 0,5 ml d'eau distillée. Le récipient est placé dans un bécher rempli d'eau à la température de la glace fondante.

Le chauffage est réalisé au gaz propane avec une flamme sous-éclairante. Une plaque métallique à ouverture circulaire s'adaptant au fond du ballon évite les caramélisations le long des parois de celui-ci.

La distillation est conduite lentement (45 mn environ) : deux fractions successives, respectivement de 1 et 2,5 ml, sont récupérées pour l'échantillon A ; quatre fractions de 2,5 ml sont obtenues pour l'échantillon B.

La teneur en éthanol des différentes fractions est déterminée par oxydation chromique (FLANZY *et al.*, 1955-1969) : leur radioactivité est mesurée par scintillation liquide dans les conditions définies par COSTES (1965).

RÉSULTATS

1. *Études sur le moût*

1. 1. *Variations des teneurs en substrats du moût au cours de la fermentation intracellulaire.*

Dans le tableau 1 (col. 1, 5, 7, 11) sont résumées les variations des teneurs du moût en acides organiques, sucres et éthanol au cours de cette expérimentation. Les teneurs en substrats, déterminées 5 heures après le début de l'essai, sont considérées comme les teneurs initiales, car elles se différencient très peu de celles du moût prélevé avant toute fermentation.

Le malate diminue au cours de la fermentation intracellulaire alors que, dans le même temps, le succinate croît et le citrate paraît stable. La teneur en acide tartrique subit des fluctuations. Ces différents résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment au cours de fermentations intracellulaires de raisins (FLANZY *et al.*, 1967). En revanche, pour des raisons inconnues, l'ensemble acides shikimique-quinique ne présente pas l'augmentation habituellement constatée dans ce type de fermentation.

L'évolution des acides aminés libres est rapportée dans le tableau 2. Aspartate et proline (dont la teneur est anormalement forte) varient de manière peu significative. Une chute importante de la teneur en glutamate et une diminution plus légère de celle en histidine, arginine, alanine sont observées. Elles s'accompagnent d'une forte augmentation du γ-aminobutyrate. Un accroissement moins important de la teneur en valine et thréonine est enregistré.

La teneur en sucres réducteurs évolue peu au cours de la fermentation intracellulaire.

La teneur en alcool éthylique passe de 190 µmoles pour 50 ml de moût (5^e heure) à 6 600 µmoles (6^e jour). Cette dernière valeur est en accord avec celles trouvées dans les expériences antérieures.

TABLEAU I

Incorporation de $^{14}CO_2$ par des baies de raisin

Variation des teneurs en substrats du moût au cours de la fermentation intracellulaire.
Distribution du ^{14}C dans ces différents substrats

Conditions expérimentales.

— Les fixations de $^{14}CO_2$ sont réalisées, à l'obscurité, à 35°C pendant 5 heures, par des lots de 65 baies de raisin (255 g) placées dans une enceinte contenant 99 p. 100 d'argon et du $^{14}CO_2$ (RT = 500 µCi ; RS = 37,9 mCi/mM). L'échantillon A est analysé à la fin de la fixation. L'échantillon B est séparé de la source radioactive, après 5 heures de contact ; il est alors replacé en anaérobiose sous argon, à l'obscurité, à 35°C durant 6 jours.

Expression des résultats.

— Les teneurs en substrats sont exprimées en micromoles (µM) pour 50 ml de moût et en micromoles pour 65 baies. (Avec un rendement théorique de 100 ml de moût pour 120 g de raisins, le volume de moût d'un échantillon est de : $\frac{255 \times 100}{120} = 212{,}5$ ml ; pour passer des valeurs relatives à 50 ml de moût aux valeurs correspondant au moût total d'un échantillon, il suffit de multiplier les premières par $\frac{212{,}5}{50} = 4{,}25$.)

— Les acides aminés sont divisés en 2 sous-groupes (théoriques) obtenus par élution de la colonne de Permutite 50 (forme H^+) par NH_4OH 2 N (acides aminés acides et neutres) et NH_4OH 4 N (acides aminés basiques).

— Le groupe « Protéines » est formé des acides aminés élués, par NH_4OH (2 N + 4 N), de la colonne de Permutite 50 où ils avaient été fixés lors du passage du « résidu insoluble » après hydrolyse. L'effluent de ce passage sur Permutite ne présente aucune activité.

— Les radioactivités totales (RT) sont exprimées en impulsions par minute (ipm) pour 50 ml de moût et pour 65 baies ; les radioactivités spécifiques (RS) en ipm par micromole.

— Les pourcentages de radioactivité (p. 100) sont rapportés à la somme partielle des différents substrats (fractions acides cétoniques, protéines, acides aminés acides, neutres et basiques, non comprises).

— La fraction protéines présentant des risques d'extinction de fluorescence (coloration jaune des extraits), leur RT n'est donnée qu'à titre indicatif.

— Les taux d'incorporation, calculés pour 65 baies, correspondent aux rapports des RT récupérées (déductions faites des RT des acides aspartique et glutamique) à la RT initialement engagée dans l'essai. Ces taux sont calculés avec un rendement du compteur de 70 p. 100 (500 µCi équivalent à $111 \cdot 10^7$ ipm, soient $777 \cdot 10^6$ ipm pour un rendement de 70 p. 100).

	A						B						
N° colonne	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Substrat	µM/50 ml moût	RT 50 ml moût	p. 100	RS	µM/65 baies	RT 65 baies	µM/50 ml moût	RT 50 ml moût	p. 100	RS	µM/65 baies	RT 65 baies	Cœff. accroiss. RS
Ac. citrique	20	9 700	0,7	485	85	41 230	20	33 560	2,1	1 680	85	142 600	3,5
Ac. isocitrique ..	1	965	0,07	965	5	5 000							
Ac. succinique ..	15	20 820	1,5	1 390	64	88 500	42	414 120	26,2	9 860	179	1 760 000	7
Ac. fumarique ..	1,5 ?	4 240	0,3		6,5	18 000	3 ?	36 000 ?	2,3	12 000?	13	153 000	—
×				2 830									
Ac. malique	460	1 345 600	96,2	2 930	1 960	5 718 800	330	1 031 250	65,2	3 125	1 400	4 382 800	
Ac. tartrique	1 530	765	0,05	0,5	6 500	3 260	1 800	900	0,06	0,5	7 650	3 830	1
Ac. skikimique	49	1 670	0,12	35	208	7 100	50	28 450	1,8	570	213	120 900	16
quinique													
Ac. glutamique ..	23	2 070	0,15	90	98	8 800	3	1 265	0,08	420	13	5 380	4,5
Ac. aspartique ..	6	2 080	0,15	350	25,5	8 840	5	970	0,06	195	21	4 120	0,5
Glucides	$58 \cdot 10^3$	9 600	0,7	0,2	$250 \cdot 10^3$	40 800	53.10^3	23 850	1,5	0,5	$225 \cdot 10^3$	101 360	2,5
Éthanol	190	930	0,07	5	800	4 000	6 610	11 370	0,7	1,7	28 100	48 320	0,35
Somme partielle .		1 398 440						1 581 735					
Ac. aminés acides		105 900				450 000							
et neutres .								85 660				264 000	
Ac. aminés													
basiques		460 pertes				1 960		15 300				65 000	
Ac. cétoniques ..		3 400				14 450		18 000				76 500	
Protéines		920				3 910		640				2 720	
Total.....						6 397 000						7 221 000	
Taux d'incorporat.						$8 \cdot 10^{-3}$						$9 \cdot 10^{-3}$	

TABLEAU 2

Teneurs en acides aminés libres du moût après 5 heures (A) *et 6 jours* (B) *de fermentation intracellulaire*

Expressions des résultats.

— Les résultats de ce tableau se rapportent uniquement aux extraits obtenus par élution au moyen de NH_4OH 2 N.

— Les quantités d'acides aminés libres sont données en µM pour 50 ml de moût et en mg par litre de moût.

— Les flèches dirigées vers le bas indiquent une diminution de la teneur en acide ; celles dirigées vers le haut indiquent une augmentation.

Acides aminés	Fidélité des dosages ± p. 100	A		B		p. 100 de variation entre A et B
		µM/50 ml moût	mg/l moût	µM/50 ml moût	mg/l moût	
Glutamique	10	23,3	68,5	3,4	10,1	87 ↘
Aspartique	15	5,6	14,9	5,2	13,8	
γ-aminobutyrique	15	26,6	54,9	51,7	106,4	94 ↗
Tyrosine	15	1,4	5,0	2,5	9,0	90 ↗
Thréonine	10	—	—	12,1	28,8	
Histidine	15	23,7	73,6	16,5	51,2	30 ↙
Arginine	15	17,0	59,0	10,1	35,2	41 ↙
Phénylalanine	15	—	—	14,3	47,0	
Leucine	10	—	—	26,3	68,8	
Alanine	10	55,3	98,4	42,2	75,2	24 ↘
Proline	25	593,9	1 366,0	535,7	1 232,0	10 ↘
Valine	10	10,4	24,3	13,0	30,4	28 ↗

1. 2. *Fixation de $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin : détection par autoradiographie de substrats radioactifs.*

Les autoradiographies sont positives, dans les essais A et B, pour les acides organiques, certains acides aminés libres, les acides cétoniques et les sucres réducteurs.

Dans l'essai A, la chromatographie sur papier de la fraction (isolée en chromatographie de partage sur gel de silice) comprenant l'acide fumarique, présente un dédoublement de taches : l'une d'entre elles correspond à l'acide fumarique, l'autre à un corps inconnu apparemment plus important sur le plan quantitatif. L'autoradiographie du chromatogramme montre l'existence de radioactivité dans les deux taches et principalement dans celle de « l'inconnu ».

Ce phénomène de dédoublement n'apparaît pas pour l'essai B. En outre, l'autoradiogramme d'une chromatographie sur papier de la fraction intéressée, surchargée en acide fumarique synthétique, présente une tache seulement sur le spot de l'acide fumarique.

Dans ces conditions, les RT et RS des fractions acide fumarique ou acide fumarique + inconnu, ne sont données qu'avec des réserves.

1. 3. *Fixation de $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin : distribution du ^{14}C dans les substrats isolés du moût après 5 heures d'expérimentation.*

Après une fixation de $^{14}CO_2$ de 5 heures (tabl. 1, col. 2, 3, 4, 6), la radioactivité se retrouve principalement dans le malate (96 p. 100) qui présente une RS très élevée. Les RS du fumarate et du succinate sont également relativement fortes, bien que la valeur concernant la RS du fumarate soit entachée d'erreur comme cela a été indiqué dans le paragraphe précédent. Une radioactivité moins importante est enregistrée dans le citrate et dans l'ensemble shikimate + quinate, dont la RS est très faible. Seules des traces de ^{14}C sont décelables dans le tartrate.

Une radioactivité beaucoup plus faible est détectée dans l'ensemble des acides aminés neutres et acides qui, à eux tous, contiennent 12 fois moins de ^{14}C que le malate. Il en résulte, en particulier, que les RS de l'aspartate et du glutamate sont faibles.

Des radioactivités faibles sont distribuées dans les acides cétoniques, les protéines ou les polypeptides, les sucres et l'éthanol. Il faut souligner que la RS de l'éthanol est 25 fois plus forte que celle des sucres.

1. 4. *Fixation de $^{14}CO_2$ par des baies de raisin : distribution du ^{14}C dans les substrats isolés du moût après 6 jours d'expérimentation.*

Six jours après la suppression de la source externe radioactive (tabl. 1, col. 8, 9, 10,12), la RS du malate demeure sensiblement constante alors que sa RT a légèrement diminué, en raison d'une faible baisse de la teneur en cet acide. En revanche, il est constaté une augmentation de la RT et de la RS des acides citrique, fumarique, shikimique + quinique, succinique. Les augmentations relatives à ce dernier acide sont très importantes. Le tartrate ne contient encore qu'une radioactivité négligeable.

Les RT du glutamate et de l'aspartate baissent nettement, mais alors que la RS de l'aspartate diminue également car sa teneur reste constante (tabl. 2), la RS du glutamate s'élève sensiblement. Les RT et RS des sucres augmentent légèrement. La RT distribuée dans l'éthanol augmente fortement (en même temps que sa teneur) mais sa RS, toujours faible, tend à diminuer et n'est plus que le triple de celle des sucres.

2. *Études sur la pulpe et les pépins*

Pour des raisons techniques, seuls des résultats partiels ont été obtenus au cours de l'analyse des fractions pulpe et pépins. C'est ainsi que les teneurs en acides organiques de certains échantillons n'ont pu être déterminées (pépins après 6 jours d'anaérobiose) ou que certaines valeurs sont manifestement anormales (teneur en tartrate de la pulpe après 5 heures d'anaérobiose et taux de récupération de l'acidité dans les fractions pulpe et pépins).

Ces résultats incomplets peuvent, cependant, présenter un intérêt dans la connaissance et l'interprétation de phénomènes propres à la fermentation intracellulaire des raisins.

2. 1. *Variations des teneurs en substrats de la pulpe au cours de la fermentation intracellulaire.*

Au cours de la fermentation intracellulaire en atmosphère d'argon pendant 6 jours, l'acidité totale minérale + organique, contenue dans la pulpe (moût résí-

duaire compris) baisse fortement de 34 000 à 11 000 µéq. pour 65 baies. Cette chute doit être surtout due aux anions minéraux car l'acidité organique varie peu. En effet, si la teneur en malate (tabl. 3) tend à diminuer, celles de succinate et shikimate + quinate restent faibles. La variation apparente de tartrate ne peut être retenue puisque la teneur obtenue après 5 heures est anormalement basse.

TABLEAU 3

Fixation de $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin

Variations des teneurs en acides organiques isolés de la pulpe.
Distribution du ^{14}C dans ces acides au cours de la fermentation intracellulaire

Conditions expérimentales.

— Les conditions expérimentales sont celles décrites dans le sommaire du tableau 1.

— La fraction pulpe est conventionnellement formée de la pellicule, des structures cellulaires et du moût non extrait au pressurage. Pour comparer les teneurs en acides, rapportées à 65 baies, du moût et de la pulpe, il convient de déduire des valeurs mesurées pour la fraction « pulpe » les valeurs correspondant au moût non extrait. Théoriquement le volume de moût est de 212,5 ml pour 65 baies et le volume réellement prélevé est de 140 ml. Il reste donc 72,5 ml de moût dans la fraction pulpe extraite. Les valeurs des teneurs en acides organiques, données dans ce tableau 3, correspondent, d'une part aux valeurs globales mesurées et d'autre, part, aux valeurs théoriques calculées (teneur de la pulpe extraite — teneur du moût interstitiel). Les teneurs du moût interstitiel sont obtenues en multipliant par 1,45 $\left(\frac{72,5}{50}\right)$ les valeurs données pour 50 ml de moût dans le tableau 1.

Expression des résultats.

— Les teneurs en acides organiques sont exprimées en µM pour 65 baies.

— Les RT et les RS correspondent aux valeurs globales mesurées.

Substrat	A				B			
	µM/65 baies mesurées	µm/65 baies corrigées	RS	RT	µM/65 baies mesurées	µM/65 baies corrigées	RS	RT
Acide citrique					30	3	8 620	258 600
Acide succinique	45	23	1 130	50 850	100	40	29 900	2 990 000
Acide malique	1 000	330	2 900	2 900 000	630	150	11 900	7 497 000
Acide tartrique	1 870 ?	0 ?	5	9 350	3 000	400	5	15 000
Acide shikimique-quinique	70	4	—	—	50	0	233	11 650

L'acidité totale des pépins baisse légèrement au cours de la fermentation intracellulaire : 639 µéq. pour 65 baies après 5 heures et 548µ éq. pour 65 baies après 6 jours d'anaérobiose.

Cette acidité et, par voie de conséquence, les teneurs en acides organiques des pépins (40µ M de malate, 4µ M de succinate et 30µ M/65 baies de tartrate) restent faibles par rapport aux valeurs correspondantes de la pulpe.

2. 2. *Fixation de $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin : distribution du ^{14}C dans les substrats isolés de la pulpe après 5 heures d'expérimentation.*

Après 5 heures de fixation de $^{14}CO_2$, le ^{14}C se retrouve, comme pour le moût, en majeure partie dans le malate (96 p. 100) (tabl. 3).

Les RS du malate et du succinate sont en accord avec celles des acides correspondants du moût. Il en est, par ailleurs, de même pour la RS du malate de la fraction pépins (2 660 ipm-μM) alors que la RS du succinate de cette dernière fraction est faible (400 ipm/μM). La RS du tartrate de la pulpe est légèrement moins basse que celle du même substrat extrait du moût.

2. 3. *Fixation de $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin : distribution du ^{14}C dans les substrats isolés de la pulpe après 6 jours d'expérimentation.*

Après 6 jours de fermentation intracellulaire, malate et succinate recueillent respectivement 70 et 20 p. 100 du ^{14}C incorporé dans les acides organiques (proportions en accord avec celles trouvées dans le moût). Les RT de ces substrats augmentent beaucoup. Les valeurs obtenues pour les RT des acides organiques de la pulpe sont nettement supérieures à celles observées dans le moût, à l'exception de la RT de l'ensemble shikimate + quinate.

Les RS augmentent fortement, en particulier pour le succinate et le malate. Ces RS sont très nettement supérieures aux RS correspondantes du moût. Le ^{14}C incorporé dans le tartrate est à l'état de traces.

DISCUSSION

1. *Remarque liminaire*

Les essais sont conduits durant respectivement 5 heures et 6 jours. Pour des durées relativement longues, comme celles-ci, la probabilité d'échanges isotopiques n'est pas négligeable. Dans ces conditions, il convient de n'accorder qu'une valeur relative aux conclusions pouvant découler de la discussion de ces résultats.

2. *Comparaison entre les essais 1967 et 1968*

Vouloir suivre un phénomène métabolique à travers deux essais utilisant des matériaux biologiques dont l'origine et l'état physiologique au moment de la cueillette sont inconnus, est, évidemment, fort discutable. Cependant, dans le paragraphe qui suit, nous admettrons que les résultats des expériences actuelles, résultats acquis après 5 heures de fixation de $^{14}CO_2$ (essai 1968), prolongent ceux obtenus après 1 et 2 heures de fixation de $^{14}CO_2$, au cours de l'expérimentation 1967 (Flanzy *et al.*, 1968). Ces durées de fixation de $^{14}CO_2$ correspondent à des points caractéristiques de la cinétique d'absorption du CO_2 par les baies de raisin en anaérobiose (travail en cours).

L'essai 1967 (Flanzy *et al.*, 1968) a porté sur 100 baies de raisin (poids 251 g, volume 250 ml) — cépage *Gros Vert*. L'essai actuel (1968) met en jeu 65 baies (255 g, 235 ml) — cépage *Alédo*. Pour les deux essais, les raisins ont été placés dans des condi-

tions expérimentales identiques (anaérobiose par l'argon-35°C — Obscurité- 500μCi $^{14}CO_2$).

De manière à mieux suivre le métabolisme des substrats du moût, au cours de la fixation de $^{14}CO_2$ (1 à 5 heures), les données relatives aux acides organiques et aux deux acides aminés libres, aspartique et glutamique, sont rassemblées dans le tableau 4.

TABLEAU 4

Comparaison des radioactivités incorporées dans certains acides du moût au cours des essais 1967 et 1968

Durée de fixation de $^{14}CO_2$	1 heure			2 heures			5 heures		
	μM/50 ml	p. 100 de RT	RS	μM/50 ml	p. 100 de RT	RS	μM/50 ml	p. 100 de RT	RS
Acide citrique	30	6	333	30	3	1 186	20	0,7	485
Acide succinique	20	20	1 730	20	5	3 095	15	1,5	1 388
Acide malique	447	74	293	447	89	2 367	464	96	2 900
Acide tartrique	3 000	0	≃ 0	3 000	0	≃ 0	1 530	0	≃ 0
Acide shikimique + quinique	—	0	0	—	0	0	49	0,1	34
Acide glutamique	41	0	0	41	< 1	24	23,3	0,15	89
Acide aspartique	6	0	0	6	< 1	213	5,6	0,15	371
Taux d'incorporation		$9 \cdot 10^{-4}$			$6 \cdot 10^{-3}$			$7{,}6 \cdot 10^{-3}$	

Les teneurs en substrats étant différentes pour les deux essais, seuls les taux d'incorporation de radioactivité et les RS sont comparables d'une expérience à l'autre.

L'augmentation du taux d'incorporation de la radioactivité dans le moût est 5 fois plus importante entre 1 et 2 heures qu'elle ne l'est entre 2 et 5 heures. Ce taux, dans les conditions des expériences, semble tendre vers un palier à la 5e heure de contact avec $^{14}CO_2$.

De la 2e à la 5e heure, une légère formation de malate peut avoir lieu (augmentation de sa RS) alors que les phénomènes générateurs de citrate et succinate paraissent diminuer d'activité ; aussi le pourcentage de radioactivité retrouvée dans le malate passe de 91 à 96 p. 100.

Le couple d'acides shikimique-quinique présente une légère radioactivité à la 5e heure.

Les RS du glutamate et de l'aspartate augmentent régulièrement de 1 à 5 heures.

3. *Évolution des acides organiques et des acides aminés*

Acide malique.

La quantité d'acide malique du moût diminue fortement entre 5 heures et 6 jours, alors que la RS reste pratiquement constante. Il en résulte une chute de sa RT qui ne représente plus que 65 p. 100 de la radioactivité mesurée du moût. Ceci s'explique par l'utilisation simultanée du malate marqué néosynthétisé et du malate non radio-

actif préexistant. Il semble donc que l'acide malique dosé dans la fraction moût soit initialement localisé dans un même type de sites cellulaires et qu'il soit facilement disponible pour les réactions métaboliques.

Dans la pulpe, parallèlement à une forte baisse de la teneur du malate, la RT de cet acide est multipliée par 2,5 et sa RS quadruple entre 5 heures et 6 jours d'expérimentation. Deux phénomènes semblent donc coexister durant cette période :

— le premier réside dans une synthèse de malate très radioactif puisque la RT croît ;

— le second consiste en la dégradation du malate existant à la 5e heure.

Les teneurs de malate radioactif néosynthétisées sont très nettement inférieures à celles, préexistantes, dégradées au cours de la fermentation intracellulaire de 6 jours.

Étant donné que la source de ^{14}C est tarie après la 5e heure, la synthèse de malate radioactif, au cours des 6 jours, peut s'expliquer par une fixation du $^{14}CO_2$ qui a été dissous dans le moût résiduaire (contenue dans la fraction pulpe) et non incorporé dans les substrats, durant l'intervalle 0-5 heures.

Cet ensemble de réflexions, et le fait que la RS de la pulpe est très nettement supérieure à celle du moût, conduisent à penser qu'il pourrait exister, dans la fraction pulpe, deux compartiments malate :

— le premier, correspondant au moût résiduaire, où, comme dans la fraction moût, la dégradation de l'acide est importante ;

— le second, localisé dans des organites cellulaires non détruits par le pressurage, où l'acide est fortement radioactif et peu transformé au cours de la fermentation intracellulaire (il faut admettre que des différences sensibles existent entre les effets destructeurs d'un pressurage relativement doux, respectant certaines structures, et le traitement brutal d'extraction des substrats de la pulpe). Une RS élevée n'apparaît pas à la 5e heure, car la concentration du malate dans le 1er groupe est encore très importante et dilue la concentration du second.

Ainsi, dans la baie de raisin placée en anaérobiose carbonique et subissant la fermentation intracellulaire, le malate serait distribué en deux compartiments :

— l'un, où l'acide malique, après avoir acquis une radioactivité moyenne, est intensément métabolisé (c'est ainsi que l'augmentation de RS du citrate dans le moût entre 5 heures et 6 jours, peut s'expliquer par une filiation malate-citrate) ;

— l'autre, résultant directement de la fixation obscure de $^{14}CO_2$, où s'accumule de l'acide malique fortement marqué et peu utilisé.

Plusieurs auteurs ont déjà mis en évidence des « compartiments » malate dans certains organes de plantes supérieures (Mac Lennan, 1963 ; Lips, Beevers, 1966 ; Hardy, 1968 ; Osmond, Laties, 1969).

Le phénomène de compartimentage ne semble pas se limiter, dans notre expérience, au malate ; il paraît exister pour d'autres acides du cycle de Krebs (citrate-succinate).

Acide aspartique-acide fumarique.

Comparée à la distribution du ^{14}C dans le malate, celle du ^{14}C du $^{14}CO_2$ dans l'aspartate apparaît constamment très faible, bien qu'elle augmente à mesure que la durée de fixation s'élève. Dans l'hypothèse où l'oxaloacétate est le premier composé formé par fixation obscure du CO_2, le fait précédent suggère que la réaction

d'amination de l'oxaloacétate en aspartate est très lente, alors que la réduction de l'oxaloacétate en malate est très rapide. Cette réduction doit même être assez poussée puisque la RS apparente du fumarate est élevée.

Acide succinique.

Dans l'hypothèse où les deux essais (1967-1968) d'incorporation de $^{14}CO_2$ sont comparables, l'examen des valeurs de la RS du succinate montre une évolution marquée de cette mesure. (Dans cette hypothèse, la diminution apparente de RS entre 2 et 5 heures est bien due à une chute réelle de celle-ci, et non à un marquage, au cours de la 2e incorporation, plus lent que dans la première.)

Entre 1 et 2 heures, les variations quantitatives d'acide sont inférieures à la fidélité de la méthode de dosage ; donc, les échanges quantitatifs sont très réduits. Puisque la RS croît, il existe une voie I, prépondérante, de synthèse de succinate radioactif.

Le ^{14}C ainsi fixé dans le succinate peut provenir soit de l'un des premiers substrats radioactifs précédemment formés, comme l'oxaloacétate ou le malate, soit de la fixation de $^{14}CO_2$ sur le propionylCoA avec la filiation méthylmalonylCoA, succinylCoA et succinate.

Entre 2 et 5 heures, il faut admettre que la quantité de succinate croît (cette augmentation est en effet une caractéristique de la fermentation intracellulaire et celle-ci a démarré puisqu'il y a déjà une production d'alcool). La RS diminuant, il y a dilution par du succinate non marqué ; ce dernier peut avoir deux origines : soit à partir de la voie I, qui n'engendre plus de succinate radioactif (ceci est difficile à admettre puisque la source du ^{14}C n'est pas enlevée) ; soit par une voie II prépondérante et qui produit du succinate à plus faible RS.

Entre 5 heures et 6 jours, une forte synthèse de succinate a lieu et la RS augmente beaucoup.

L'activité de la voie I peut continuer mais tend plutôt à diminuer si elle est directement liée à la présence du $^{14}CO_2$, car après 5 heures seul reste le $^{14}CO_2$ dissous dans le jus. Indépendamment de cette solution deux interprétations sont proposées :

la voie II synthétise du succinate à forte RS ;

une voie III débute avec une très forte RS du succinate pour contrebalancer la dilution due à la voie II (cette voie III peut être en fait l'ancienne voie I réactivée à partir de recombinaisons ou de décarboxylations de métabolites précédemment marqués).

Il est intéressant de noter certaines évolutions d'acides aminés libres, évolutions qui pourraient peut-être interférer avec le métabolisme du succinate au cours de la fermentation intracellulaire. C'est ainsi que la proline perd une cinquantaine de µM/50 ml de moût alors que le γ-aminobutyrate et le succinate en gagnent chacun 25. Cette augmentation de γ-aminobutyrate a déjà été signalée dans des conditions expérimentales proches de celles définies dans l'essai actuel (Wickemasingue *et al.*, 1963 ; Mujdaba *et al.*, 1968). En outre, la teneur en glutamate diminue fortement alors que sa RS, bien que faible, croît et dépasse celle de l'aspartate.

Acides citrique et isocitrique.

La distribution du ^{14}C, à partir de l'oxaloacétate, dans le citrate et l'isocitrate,

reste faible pendant la fixation de $^{14}CO_2$. Elle augmente légèrement au cours de la fermentation intracellulaire prolongée.

Autres acides.

La radioactivité décelée dans le tartrate est négligeable tout au long de l'expérimentation. Ceci implique que l'acide tartrique n'est pas directement concerné par les phénomènes d'incorporation de CO_2 et par les voies classiques du métabolisme intermédiaire (sans pour cela préjuger de la destinée de l'acide tartrique au cours du type de fermentation étudié).

Il est évident, d'après les résultats, que l'étude du métabolisme de cet acide dans la baie de raisin en anaérobiose doit être entreprise en utilisant des substrats radioactifs autres que $^{14}CO_2$. Il semble qu'il en soit de même de l'étude du métabolisme des acides shikimique + quinique, bien que le coefficient d'accroissement de leur RS soit le plus élevé de tous les acides organiques entre 5 heures et 6 jours d'anaérobiose.

4. *Formation d'alcool éthylique et de sucres réducteurs*

Une quantité mesurable d'éthanol apparaît dès la 5^e heure. Sa RS, faible par rapport à celles des principaux acides du métabolisme intermédiaire, est, cependant, très supérieure à la RS des sucres réducteurs ;

Ces observations conduisent aux réflexions suivantes :

1^o il existe une voie de formation de glucides à partir d'un composé primaire accepteur de $^{14}CO_2$. Les sucres sont constamment peu marqués. Un tel fait se comprend car la distribution du ^{14}C, à partir de l'oxaloacétate, est très fortement orientée vers le malate. Dans ces conditions, la conversion de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate puis en sucres ne peut être que très ralentie.

2^o la production d'alcool doit être due à deux phénomènes :

· d'une part, celui de la fermentation alcoolique normale qui doit être quantitativement le plus important;

· d'autre part, celui utilisant, à partir d'un composé primaire accepteur de CO_2 (phosphoénolpyruvate par exemple), une voie faisant intervenir certains substrats différents de ceux de la glycolyse.

En effet, si l'éthanol provenait uniquement de la transformation des sucres, sa RS serait au plus égale à la leur. En outre, si la formation de l'alcool était seulement due à un prolongement des voies normales de distribution du $^{14}CO_2$ dans les conditions de l'expérience (Flanzy *et al.*, 1968), la RS devrait être au moins du même ordre de grandeur que celle des acides organiques du cycle de Krebs.

Il est donc vraisemblable que cette dernière voie donne une faible quantité d'alcool assez fortement radioactif, la radioactivité obtenue étant diluée par l'alcool provenant de la fermentation alcoolique.

L'hypothèse ainsi formulée semble d'ailleurs trouver un appui supplémentaire dans le fait qu'au 6^e jour, la RS de l'alcool a diminué et celle des sucres a augmenté. La formation de sucres semble continuer (RT croît, mais n'est-ce pas dû à des échanges isotopiques ?) et la fermentation alcoolique est prépondérante, donc dilue davantage l'alcool très radioactif de l'autre voie.

La RT des sucres n'est pas négligeable. Ceci explique partiellement les difficultés que l'on rencontre pour dresser un bilan sucres-alcool en fermentation intracellulaire sous atmosphère de CO_2 (ANDRÉ, FLANZY, 1967).

5. *Incorporation de radioactivité dans les protéines*

Les acides aminés provenant de l'hydrolyse des protéines ou des polypeptides solubles dans le moût présentent une faible radioactivité dès la 5e heure. Au 6e jour, la RT des protéines de la pulpe est 50 fois supérieure à celle des fractions correspondantes du moût et des pépins.

Une synthèse de protéines se produit donc à partir de CO_2 exogène (MEYNHARDT, 1963). Cette synthèse est surtout sensible au niveau des structures cellulaires non détruites par le pressurage.

Les pépins qui, par ailleurs, présentent des métabolismes ralentis par rapport au moût et à la pulpe, incorporent autant de radioactivité dans leurs protéines que la fraction moût.

6. *Cinétique des décarboxylations*

La RT, rejetée principalement sous forme de CO_2 (tabl. 5) est importante à la 5e heure (cette valeur élevée est due, en majeure partie, au $^{14}CO_2$ non absorbé par

TABLEAU 5

Radioactivité dégagée sous forme de $^{14}CO_2$, au cours de la fermentation intracellulaire, après la suppression de la source externe radioactive

Conditions expérimentales.

— Le $^{14}CO_2$ dégagé au cours des 6 jours qui suivent la suppression de la source externe radioactive est recueilli quotidiennement dans de la soude éthanolique contenue dans des barboteurs placés en série. La radioactivité du carbonate de soude ainsi formé est ensuite mesurée.

Expression des résultats.

— Les valeurs rapportées correspondent aux RT, en milliers d'ipm pour 65 baies, du CO_2 piégé quotidiennement.

— Les solutions après piégeage du CO_2 sont très troubles et prennent un aspect pâteux : une extinction de fluorescence se produit certainement. Dans ces conditions, les RT ne sont données qu'à titre indicatif, avec un rendement du compteur de 70 p. 100.

— Des pertes par projections ont eu lieu dans le piège du premier jour.

— Les taux de piégeage ou de radioactivité dégagée sous forme de $^{14}CO_2$ correspondent aux rapports des radioactivités retrouvées dans les barboteurs à soude éthanolique, à la radioactivité initiale de la source externe ($777 \cdot 10^6$).

— Après 5 heures de fixation de $^{14}CO_2$ et avant la suppression de la source externe radioactive, un balayage par l'argon avait permis de récupérer dans une série de barboteurs à soude éthanolique une RT de 40 600 milliers d'ipm, soit un taux de piégeage de $5 \cdot 10^{-2}$.

	1 jour	2 jours	3 jours	4 jours	6 jours
RT milliers ipm pour 65 baies	1 300	10 300	3 900	3 600	2 600
Taux de piégeage	$1{,}6 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$4{,}5 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$

les raisins). Elle diminue progressivement au cours de la fermentation intracellulaire.

En corollaire, alors que le taux d'incorporation dans le moût croît très légèrement entre 5 heures et 6 jours (7,7 à $8{,}8 \cdot 10^{-3}$), le taux de la radioactivité retrouvée dans les pièges chute fortement pendant le même temps ($5 \cdot 10^{-2}$ à $3 \cdot 10^{-3}$).

Ces résultats paraissent confirmer les observations selon lesquelles les décarboxylations, accélérées en début de fermentation intracellulaire, se ralentissent régulièrement au cours de ce phénomène (Flanzy, André, 1965).

CONCLUSIONS

— Le $^{14}CO_2$ dissous dans le suc cellulaire est progressivement intégré dans les substrats par les systèmes enzymatiques de la baie de raisin. Le taux d'incorporation de la radioactivité ne croît plus que lentement à partir de la 5^e heure de contact gaz carbonique-raisins. La radioactivité se retrouve surtout au niveau des acides organiques et des acides aminés. L'acide malique contient la majeure partie de la radioactivité du moût. Il existerait une répartition du malate, du succinate et du citrate, en compartiments cellulaires, de vocations métaboliques distinctes.

Les acides shikimique-quinique (précurseurs possibles de composés aromatiques) voient leur RS augmenter fortement en fonction de la durée d'anaérobiose, alors que le tartrate ne présente pas de marquage. Une très faible synthèse d'alcool éthylique et de sucres réducteurs a lieu. Outre la voie habituellement admise de la fermentation alcoolique, il doit exister une autre voie métabolique de formation d'éthanol. Les protéines du raisin incorporent rapidement une radioactivité.

— Ces résultats méritent d'être confirmés au cours d'essais où les conditions expérimentales réalisées en 1967 et 1968 se trouveront rassemblées. En outre, il serait souhaitable de multiplier le nombre de prélèvements tout au long de la fermentation intracellulaire de façon à mieux suivre le cinétique de ce phénomène au niveau des substrats du métabolisme intermédiaire. En effet, en vinification par macération carbonique, l'importance d'une saturation préalable par du CO_2 de l'atmosphère de la cuve, avant son remplissage par la vendange, apparaît nettement ; le gaz carbonique, non seulement joue son rôle d'antioxydant, mais participe encore au métabolisme de la baie de raisin.

Reçu pour publication en août 1969.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Professeur P. Jaulmes (Laboratoire de Chimie analytique et de Toxicologie, Faculté de Pharmacie de Montpellier) des conseils précieux qu'il nous a prodigués pour la distillation et la concentration de faibles quantités d'éthanol.

SUMMARY

FIXATION OF $^{14}CO_2$ IN DARKNESS BY GRAPES IN ANAEROBIC CONDITIONS
II. — FATE OF ^{14}C DURING INTERCELLULAR FERMENTATION

Sound, ripe grapes of the *Aledo* variety were placed in an environment of which the atmosphere, made up of 99 p. 100 argon, was subsequently enriched with $^{14}CO_2$ for five hours in the dark at 35°C. After this interval one batch of the grapes was analyzed. A second batch of the grapes was replaced in the argon atmosphere after removal of the radioactive source, and was analyzed after six days under anaerobic conditions.

The distribution of the ^{14}C was traced in different substrats of the must, pulp and pips. Radioactivity was found chiefly in the organic acids of the Krebs cycle and the free amino-acids. Other compounds appeared equally pronounced : shikimic and quinic acids, reducing sugars, proteins.

Their respective incorporation into the must, pulp and pips is compared and discussed.

RESUMEN

FIJACIÓN EN LA OSCURIDAD DEL $^{14}CO_2$ GASEOSO POR LAS BAYAS DE UVA, EN ANAEROBIOSIS
II. — TRANSFORMACIÓN DEL ^{14}C DURANTE EL TRANSCURSO DE LA FERMENTACIÓN INTRACELULAR

Dos bayas de uva, variedad *Aledo*, maduras y sanas, son dispuestas en recintos cuya atmósfera formada de un 99 p. 100 de argón, queda enriquecida acto seguido por $^{14}CO_2$. Las bayas permanecen en presencia del $^{14}CO_2$ durante cinco horas, a 35°C, en la oscuridad. Pasado este lapso de tiempo, una partida de bayas es sometida a análisis. Las bayas de una segunda partida son situadas en atmósfera de argón, previa supresión de la fuente radiactiva, y son analizadas al cabo de seis días de anaerobiosis.

La distribución de ^{14}C es objeto de investigación en distintos substratos aislados del mosto, de la pulpa y de las pepitas. La radioactividad se encuentra principalmente en los ácidos orgánicos del ciclo de Krebs y los ácidos aminados libres. Otros compuestos aparecen también marcados, a saber : ácidos squímico y quínico, azúcares reductores, proteines.

Les incorporaciones respectivas en el mosto, la pulpa y las pepitas son luego objeto de comparación y discusión.

RIASSUNTO

FISSAZIONE ALL'OSCURITÀ DEL $^{14}CO_2$ GASSOSO DA PARTE DELLE BACCHE D'UVA, IN ANEROBIOSI
II. — DIVENIRE DEL ^{14}C NEL CORSO DELLA FERMENTAZIONE INTRACELLULARE

Delle bacche d'uva, varietà *Aledo*, mature e sane, sono poste in recinti la cui atmosfera, formata di 99 p. cento di argon, è in seguito arricchita con del $^{14}CO_2$. Le bacche sono lasciate in presenza del $^{14}CO_2$ durante cinque ore, a 35°C, nell'oscurita. Passato questo periodo, un lotto di bacche viene analizzato. Le bacche d'un decimo di lotto sono riposte in atmosfera d'argon, dopo soppressione della sorgente radioattiva, e sono analizzate al termine di 6 giorni di anaerobiosi.

La distribuzione del ^{14}C è ricercata in differenti sottostrati isolati del mosto, della polpa e dei vinacciuoli. La radioattività è ritrovata principalmemte negli acidi organici del ciclo di Krebs e gli acidi aminati liberi. Altri composti appariscono egualmente marcati : acido scichimico, chinico zuccheri riduttori, proteine.

Le incorporazioni rispettive nel mosto, la polpa, i vinacciuoli, sono pagagonati e discussi.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

André P., Flanzy C., 1967. Vinification avec Macération Carbonique. *II^e Symposium International d'Œnologie*, Institut national de la Recherche agronomique, Paris.

Costes C., 1965. *Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des caroténoïdes dans les feuilles*, 57-64. Thèse Doctorat, Institut national de la Recherche agronomique, Paris.

Flanzy M., Bouzigues L. M^me, Bouzigues H., 1955. La détermination chimique du degré alcoolique du vin par le mélange sulfochromique. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 397-415.

Flanzy C., André P., 1965. Note sur le métabolisme des raisins en situation d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 173-178.

Flanzy C., André P., Flanzy M., Chambroy Y., 1967. Variations quantitatives des acides organiques stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. II. Influence de la durée d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 89-107.

Flanzy C., Flanzy M., André P., Chambroy Y., 1968. Fixation à l'obscurité du $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin, en anaérobiose. *Ann. Technol., agric.*, **17**, 287-297.

Flanzy M., Bénard P., Flanzy C., Schobert A., 1969. Publication en cours.

Hardy P. J., 1968. Metabolism of sugars and organic acids in immature grape berries. *Plant Physiol.*, **43**, 224-228.

Jaulmes P., 1968. Communication personnelle.

Jolivet E., 1969. *Métabolisme des acides organiques et des acides aminés libres chez le tubercule de pomme de terre* (Solanum Tuberosum *L.*) *au cours de la cessation spontanée de son repos végétatif et au cours de la rupture provoquée de son repos par la rindite.* Thèse Doctorat, Institut national de la Recherche agronomique, Paris.

Kohn-Abrest E., 1948. *Précis de Toxicologie*, 139, 2^e Édit. Doin et C^ie, Paris.

Lips S. H., Beevers H., 1966. Compartmentation of organic acids in corn roots I. Differentiel labeling of 2-malate pools. *Plant. Physiol.*, **41**, 709-712.

Mac Lennan D. H., Beevers H., Harley J. L., 1963. « Compartmentation » of acids in plant tissues. *Biochem. J.*, **89**, 316-27.

Meynhardt J. T., 1963. Assimilation of ^{14}C-labelled carbon dioxyde by *Barlinka* grape berries. *Proc. nation., Conf. nuclear Energy. S. Africa*, 456-463.

Mujdaba F., Mihalca A., Marins S., 1968. Qualité des vins en rapport avec les nouvelles techniques de vinification : macération carbonique, vinification continue, chauffage de la vendange. *XII^e Congrès International de la vigne et du vin.* Bucarest. Off. internation. Vigne, Vin, rue Roquépine, Paris 8^e.

Osmond C. B., Laties G. G., 1969. Compartmentation of malate in relation to ion absorption in beet. *Plant Physiol.*, **44**, 7-14.

Wickremasinghe R. L., Swain T., Goldstein J. L., 1963. Accumulation of amino-acids in plant cell. Tissue cultures. *Nature*, 1302-1303.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (4), 327-338.

NOUVELLE TECHNIQUE DE DOSAGE DES TANINS LEUCOANTHOCYANIQUES. APPLICATIONS

M. FLANZY, S. AUBERT et M. MARINOV [1]

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Une nouvelle technique de dosage de composés leucoanthocyaniques est proposée à partir de la séparation des polyphénols sous forme de précipité avec le sulfate mercurique de SÉMICHON-FLANZY.

L'intérêt de cette méthode est étudié en la confrontant, d'une part avec l'évaluation directe, sans isolement préalable, sur des cas possibles et, d'autre part, avec une technique connue de fixation des leucoanthocyanines sur une poudre de polyamide.

Ces essais portent sur des vins, des jus de raisins et des extraits de pulpe de quelques fruits.

INTRODUCTION

Les composés phénoliques du type leucoanthocyanes participent aux qualités organoleptiques et nutritionnelles de nombreux produits végétaux : aspect, flaveur et propriétés physiologiques (SWAIN, 1962).

Ces leucoanthocyanes sont des flavanols (plus spécialement des flavanes-3-4 diols) plus ou moins polymérisés qui présentent des caractères tanins : c'est-à-dire essentiellement l'aptitude à s'associer avec des composés protéiques (HASLAM, 1966).

Leur évaluation a pour principe la transformation spécifique des flavanes 3-4 diols en anthocyanidols par chauffage en milieu acide.

La mesure colorimétrique des pigments rouges formés à partir d'un extrait végétal est perturbée par trois difficultés principales :

1. un faible taux de transformation, de l'ordre de 10 à 30 p. 100, variable avec la source de flavanols et le milieu réactionnel (SMATHERS et CHARLEY, 1967) ;

[1] Stagiaire de l'Institut supérieur des Industries alimentaires, Plovdiv, Bulgarie.

2. les composés leucoanthocyaniques les plus polymérisés sont difficilement extractibles de la cellule végétale (GOLSTEIN et SWAIN, 1963) ; leur dosage est aléatoire dans des broyats hétérogènes comme les pulpes de fruits ;

3. il faut prévenir la présence d' « artefacts » dont l'absorption spectrophotométrique n'est pas négligeable autour de la zone considérée (DO à 550 nm). Ainsi, les combinaisons sucres-protéines, à chaud, peuvent donner les produits bruns de la réaction de Maillard (mélanoïdines).

Dans ce but, diverses techniques ont été proposées pour faire un isolement préalable des composés leucoanthocyaniques et améliorer leur dosage (MASQUELIER, 1955, 1956, 1959, 1963). Les produits de la vigne sont particulièrement riches en polyphénols.

Nous nous sommes penchés plus particulièrement sur les tanins des vins constitués surtout par des formes polymérisées de leucocyanidol (MASQUELIER, MICHAUD et TRIAUD, 1965).

En effet, un travail précédent (FLANZY et AUBERT, 1968) nous avait montré la possibilité d'utilisation d'un nouvel agent de séparation des polyphénols du vin.

L'action du réactif au sulfate mercurique de SÉMICHON-FLANZY (1926) est à rapprocher de celle d'autres sels métalliques (NÉGRE, 1945), des solutions salines saturées (MASQUELIER, VITTE et ORTEGA, (1959). Cette précipitation de substances tannoïdes est confrontable aux agents habituels d'isolement des tanins : poudres de peau, alcaloïdes (MONTIES et JACQUIN, 1966), gélatine (RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1966) et autres substances à structure protéique (SINGLETON, 1967).

Sur cette base, nous avons pu utiliser cette technique originale pour des dosages comparatifs de vins blancs (FLANZY et AUBERT, 1969). Le but de cette étude est de contrôler la valeur et les limites de ce nouveau procédé analytique sur divers matériaux et plus particulièrement les extraits de fruits.

Cette épreuve est faite parallèlement avec l'essai d'un support de leucocyanidine connu : la poudre de polyamide (MASQUELIER, 1963). Certains flavanols sont retenus par les poudres de nylon ou de polyvinylpyrrolidones, mais cette absorption se fait préférentiellement pour les formes les moins polymérisées (SINGLETON, 1967).

La sélection des polyphénols par le réactif au sulfate mercurique est vraisemblablement différente de celle des autres agents de fixation des tannoïdes. Elle présente ainsi un intérêt théorique et pratique complémentaire.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Nous donnerons successivement :

— la description du mode opératoire général de la technique proposée utilisant le sulfate mercurique et le mode d'expression des résultats obtenus sous forme pondérale ;

— des indications sur la technique de dosage des leucoanthocyanes par fixation sur poudre de nylon que nous avons utilisée comparativement à la précédente ;

— le mode d'extraction des leucoanthocyanes dans le cas des fruits.

A. — *Mode opératoire général*

Dans les 4 godets en verre (25 ml) d'une centrifugeuse on verse 10 ml de prise d'essai (vin, jus ou extrait végétal, aqueux ou alcoolique, homogénéisé). On ajoute respectivement 0,1-0,2-0,3-0,4 ml de réactif au sulfate acide mercurique.

La préparation de ce réactif, utilisé dans la défécation des vins, a été donnée par Sémichon et Flanzy (1926). Ce réactif est incolore et son pH est voisin de 0,5.

Après agitation quelques minutes à température ambiante, on centrifuge 5 minutes à 5 000 t/mn (3 500 *g* environ) et élimine le liquide surnageant le dépôt (on peut éventuellement reprendre ce milieu déféqué par un nouvel ajout de réactif).

Le culot est agité avec 20 ml d'éthanol 50 p. 100 et ce lavage est éliminé après décantation centrifuge (on peut éventuellement soit augmenter, soit diminuer, ce lavage avec de l'eau ou de l'alcool).

Le précipité est repris par 20 ml de butanol-chlorhydrique (60-40 en vol.) en agitant dans le godet. Puis, on centrifuge pour éliminer les particules non dissoutes et obtenir un liquide surnageant parfaitement limpide.

On mesure sans attendre la densité optique à 550 nm de ce liquide : soit D_1 à froid (15-20 °C).

10 ml de la liqueur sont ensuite portés à ébullition dans un ballon de 30 ml sous reflux, avec un grain de pierre ponce, pendant 30 minutes.

On refroidit sous un courant d'eau froide, ou dans la glace fondante pendant 5 minutes et mesure la DO à 550 nm sans attendre : soit D_2 (après chauffage).

Remarques.

1. Pour obtenir un meilleur taux de transformation : leucoanthocyanes-anthocyanidols, il est préférable d'opérer la réaction et les manipulations à l'abri de la lumière (dégradation des aglycones).

On peut également améliorer le rendement en introduisant dans le milieu des traces de sulfate ferreux (Govindarajan et Mathew, 1965).

2. Pour que les valeurs de D_1 et D_2 restent dans les limites convenables d'échelle spectrophotométrique, on peut diluer les solutions :

— soit au niveau de la dissolution du précipité mercurique et des mesures.

— soit au niveau de la prise d'essai diluée ou non dans de l'eau.

3. Les 4 godets de la centrifugeuse donnent 4 valeurs de la différence $D_2 - D_1$. Pour ces différentes mesures, la valeur la plus élevée se situe normalement entre 0,1 et 0,4 ml de réactif mercurique ; dans le cas contraire, on recommencera les dosages en opérant sur des dilutions, soit plus élevées soit moins fortes, ceci afin d'obtenir les meilleures conditions de séparation et de transformation des leucoanthocyanes.

4. On pourrait également intervenir sur la quantité de réactif utilisée, mais alors il faudrait tenir compte de l'augmentation d'acidité qui conditionne aussi la précipitation des matières tannoïdes ; le précipité se solubilise dans un milieu fortement acide.

5. D'autre part, dans le cas des jus pulpeux, une des difficultés est d'obtenir une suspension bien homogène par une dispersion vigoureuse au moment de la prise d'essai.

B. — *Expression des résultats*

Dans des mesures comparatives, sur une série d'échantillons, la différence $D_2 - D_1$ donne un indice de teneur en leucoanthocyanes.

Les extraits étalons de leucoanthocyanes sont très rares et difficiles à conserver dans un état déterminé d'oxydation et de polymérisation.

Pour tourner cette difficulté, dans l'expression pondérale des résultats, nous avons adopté la formule conventionelle de calcul proposée par Lebreton, Jay et Voirin (1967). Ces auteurs ont admis que le rendement de transformation du leucocyanidol en cyanidol était de l'ordre de 17 p. 100 ; sur cette base, ils donnent la teneur en leucocyanidine d'un extrait végétal de la façon suivante :

$$\text{teneur en mg/g en leucocyanidine} = 6 \cdot \frac{DO}{\varepsilon} MV_s \frac{1}{p}$$

où M = 306 ; D.O = densité optique à 550 nm

$\varepsilon = 34{,}7 \times 10^2$ = coefficient d'extinction moléculaire de la cyanidine

V_s = volume de solution et p = poids de la prise d'essai,

soit dans le cas d'un liquide et une prise d'essai de V_p ml :

$$\text{teneur en mg/litre en leucocyanidine} = 5{,}2 \times 10^{-2} \times DO \times \frac{V_s}{V_p} \times 10^3$$

Sur les données de notre mode opératoire général, on obtient :

$$\text{teneur en mg/litre en leucocyanidine} = 5{,}2 \times 10^{-2} \times (D_2 - D_1) \times \frac{20}{10} \times 10^3$$

$$= 104 \times (D_2 - D_1)$$

C. — *Technique de dosage des leucoanthocyanes par fixation sur poudre de nylon*

Nous avons repris la technique donnée dans le cas des vins blancs par Masquelier (1963), mais à partir d'un polyamide différent (marque Rhodiaceta, type nylon Technyl FE500 40 A) dont les caractéristiques et le pouvoir absorbant des polyphénols étaient indéterminés. Cette poudre de nylon est conservée et utilisée légèrement humide pour ne pas diminuer ses propriétés physico-chimiques. Afin de comparer les résultats obtenus avec les deux agents de séparation des polyphénols, le mode opératoire est identique à celui donné précédemment ; le réactif mercurique est remplacé par 1 g de nylon. La dissolution du nylon se fait dans les mêmes conditions que le précipité mercurique et les leucoanthocyanes fixés sont transformées par chauffage de la liqueur 30 minutes à 100°C.

D. — *Extraction des leucoanthocyanes des fruits*

Les extraits de pulpe de fruit sont réalisés de la façon suivante : 40 à 200 g de pulpe de fruits, dénoyautés ou épépinés, sont finement broyés dans un appareil de type Mixer en présence de 1 volume d'éthanol à 50 p. 100 d'eau. Le mélange est conservé en flacon plein, bouché hermétiquement et à température de 0 + 5°C avant analyse (de 5 à 24 h d'attente).

Le dosage des leucoanthocyanes peut être effectué :

— sur le mélange directement après homogénéisation (jus brut) ;
— sur le liquide surnageant après centrifugation plus ou moins poussée (jus centrifugé) ;
— après dilution dans de l'eau et une nouvelle décantation éventuelle ;
— sur d'autres milieux hydro-alcooliques.

RÉSULTATS

Les tableaux 1 et 2 correspondent à l'analyse de vins rouges et blancs, de teneurs en tanins très différentes, dans diverses conditions opératoires. Sur ce milieu parfaitement homogène on a cherché à étudier l'influence du réactif mercurique :

— d'une part, sur la quantité de tanins leucoanthocyaniques précipités ;

— d'autre part, sur le rendement de transformation des leucoanthocyanes en cyanidol rouge.

En opérant sur des vins pauvres en sucres résiduaires et en composés azotés, on a pu effectuer en parallèle la transformation des leucoanthocyanes :

1. directement, avec ou sans présence de sulfate mercurique ;
2. après fixation sous forme de précipité mercurique et les lavages ;
3. après absorption sur nylon et dissolution dans les mêmes conditions.

Le tableau 3 rapporte l'analyse de jus de raisin industriels en comparant notre méthode et la technique de fixation sur nylon ; d'autre part, de sources différentes.

Les écarts de teneurs en leucoanthocyanes des jus de prunes dans diverses conditions de dilution et de clarification permettent de souligner l'importance de l'échantillonnage.

Sur les extraits de pulpe de fruits (cerise, abricot, pêche), pour chaque échantillon, on a donné deux teneurs correspondant à deux essais dans des conditions de précipitation sensiblement différentes. On note que les écarts relatifs sont variables. Pratiquement, le mode opératoire général proposé devrait être adapté à chaque cas particulier.

TABLEAU I

Tanins leucoanthocyaniques des vins rouges (Carignan noir)

Influence de l'agent de séparation : réactif mercurique ou nylon Conditions de dosage des tanins	Volume de solvant Butanol-HCl (60-40 v) (en ml)	D_1 (15-20°C)	D_2 (après chauffage)	Leucocyanidine (en mg/l)	Taux de récupération (%)
Échantillon 1 : Vin peu coloré et peu astringent	(reflux 30 mn)				
a) *Dosage direct* (*sans séparation des tanins*)					
2 ml vin non dilué (témoin)	20	0,263	0,450	107	100
2 ml vin + 0,3 ml réactif mercurique	20	0,162	0,330	97,5	91
b) *Après précipitation ou absorption sur nylon*					
2 ml vin + 20 ml eau + 0,3 ml réactif mercurique	20	0,133	0,313	93	87
2 ml vin + 20 ml eau + 1 g nylon	20	0,050	0,077	14	13
Échantillon 2 : Vin très coloré et astringent					
a) *Dosage direct* (*sans séparation des tanins*)					
2 ml vin non dilué (témoin)	50	0,360	0,865	1 315	100
2 ml vin + 0,3 ml réactif mercurique	50	0,360	0,845	1 260	96
b) *Après précipitation ou absorption sur nylon*					
20 ml vin dilué au 1/100 + 0,3 ml réactif mercurique	10	0,150	0,515	950	72,5
20 ml vin dilué au 1/100 + 1 g nylon	10	0,117	0,330	320	24,4

TABLEAU 2

Tanins leucoanthocyaniques des vins blancs

Influence de l'agent de séparation et de la durée du chauffage — Conditions de dosage	Butanol-HCl (60-40 v) (en ml) Durée du reflux en minutes	D_1 (15-20°C)	D_2 (après chauffage)	Leucocyanidine (en mg/l)	Taux de récupération (%)
Carignan blanc sec					
a) *Dosage direct (sans séparation des tanins)*					
10 ml vin (témoin 10 mn reflux)	20 } 10 mn	0,030	0,134	10,8	93
10 ml vin + 0,4 ml réactif mercurique	20 } 10 mn	0,030	0,120	9,35	80
10 ml vin (témoin 30 mn reflux)	20 } 30 mn	0,027	0,139	11,65	100
10 ml vin + 0,4 ml réactif mercurique	20 } 30 mn	0,027	0,131	10,8	93
10 ml vin (témoin 40 mn reflux)	20 } 40 mn	0,030	0,163	13,8	118,5
10 ml vin + 0,4 ml réactif mercurique	20 } 40 mn	0,030	0,116	8,95	77
b) *Après précipitation ou absorption sur nylon*					
10 ml vin + 0,4 ml réactif mercurique	20 } 30 mn	0,015	0,100	8,85	76
10 ml vin + 1 g nylon	20 } 30 mn	0,020	0,060	4,15	35,5
Grenache blanc doux					Écarts par rapport à la moyenne (%)
Influence des conditions de précipitation					
20 ml vin + 0,2 ml réactif mercurique	20	0,182	0,715	27,7	— 4 (12,5)
20 ml vin + 0,4 ml — —	20	0,175	0,780	32,0	+ 0,3 (0,95)
10 ml vin + 0,25 ml — —	20	0,090	0,420	34,3	+ 2,6 (8,2)
10 ml vin + 0,3 ml —	20 } 30 mn	0,090	0,418	34,2	+ 2,5 (7,9)
20 ml vin + 0,6 ml — —	20	0,160	0,790	32,8	+ 1,1 (3,5)
20 ml vin + 0,8 ml — —	20	0,145	0,710	29,4	— 2,3 (7,3)
(Moyenne sur les 6 dosages)	20			(31,7)	0 (0)

TABLEAU 3

TABLEAU 3

Tanins leucoanthocyaniques des extraits de fruits

Influence des conditions d'échantillonnage (Prise d'essai. Dilution. Centrifugation)	Réactif mercurique ou nylon	Butanol-chlorhydrique (en ml) (reflux 30 mn)	Volume de solvant D_1 (15-20°C)	D_2 (après chauffage)	Teneur en leucocyanidine
Jus de raisin rouge (limpide) (1)					
10 ml jus dilué au 1/20 dans eau	0,2 ml r. m.	20	0,250	0,495	510 mg/l
10 ml jus dilué au 1/5 dans eau	1 g nylon	20	0,162	0,400	124 —
Jus de raisin blanc (limpide) (1)					
10 ml jus dilué au 1/10 dans eau	0,2 ml r. m.	20	0,026	0,094	71 —
10 ml jus non dilué	1 g nylon	20	0,062	0,630	59 —
(1) Obtenus par la technique industrielle « sulfitation-désulfitation »					
Jus de prune d'Ente (dense et très trouble) (2)					
A. 5 ml jus centrifugé, puis ajout 20 ml eau et réactif	0,2 ml r. m.	100	0,078	0,350	283 mg/l
B. 1 ml jus centrifugé, puis ajout 20 ml eau et réactif	0,2 ml r. m.	20	0,078	0,370	304 —
C. 5 ml jus centrifugé, dilué au 1/5 recentrifugé prise de 5 ml et *idem* A	0,2 ml r. m.	20	0,054	0,162	112 —
D. 5 ml jus brut épais, dilué au 1/5 centrifugé prise de 5 ml et *idem* A	0,2 ml r. m.	20	0,083	0,248	172 —
(2) Obtenus sur fruits frais avec un extracteur ménager « Moulinex »					
Cerises « Bigarreaux » (mûres) (3)					
Variété rouge extrait dilué au 1/10 et prise de 2 ml après centrifugation	0,2 ml r. m.	20	0,112	0,188	855 mg/kg
	0,4 ml r. m.	20	0,077	0,165	990 —
Variété blanche sans dilution	0,2 ml r. m.	20	0,034	0,110	79 —
	0,4 ml r. m.	20	0,033	0,103	73 —
Abricots « Rouge du Roussillon » (très mûrs) (3)					
Prise 5 ml d'extrait centrifugé	0,4 ml r. m.	200	0,015	0,092	343 mg/kg
Prise 2 ml d'extrait centrifugé	0,4 ml r. m.	20	0,078	0,384	340 —
Pêches (variété blanche et demi-mûres)					
Prise 5 ml d'extrait centrifugé	0,4 ml r. m.	80	0,040	0,177	70 —
Prise 2 ml d'extrait centrifugé	0,4 ml r. m.	20	0,014	0,066	66 —
(3) Pulpe broyée au mixer en présence 1 vol. éthanol 50 %					

DISCUSSION

A. — *Influence du réactif mercurique dans la transformation des leucoanthocyanes en anthocyanidols*

La présence du sel mercurique (sulfate) diminue légèrement le rendement de transformation des leucoanthocyanes par chauffage dans le milieu butanol-chlorhydrique adopté.

En effet, fixons conventionnellement à 100 p. 100 le taux de transformation des échantillons dosés directement sans réactif mercurique. Avec une dilution de 10 fois à 50 fois la prise d'essai dans le milieu butanol-chlorhydrique et pour une quantité de réactif mercurique de 1,5 à 0,6 p. 100 du volume réactionnel, on trouve respectivement dans le cas des vins rouges (tabl. 1) : 91 et 96 p. 100 pour les deux échantillons étudiés. Le rendement de transformation des leucoanthocyanidols en anthocyanidols est meilleur si le réactif est plus dilué.

Dans le cas des vins blancs (tabl. 2), ce taux de transformation est de 93 p. 100 avec 2 p. 100 de réactif. Ce rendement n'est pas amélioré si la durée de chauffage est diminuée (80 p. 100) ou augmentée (77 p. 100), alors que le témoin correspondant à 40 mn de reflux est plus fort (118 p. 100).

On peut admettre que l'effet du sel mercurique dans les conditions de notre mode opératoire général entraîne un écart inférieur à 10 p. 100 avec les concentrations en réactif données.

Compte tenu des approximations faites sur les rendements théoriques de la réaction, on peut considérer ce phénomène comme négligeable dans des dosages comparatifs.

B. — *Taux de récupération des tanins leucoanthocyaniques après isolement par précipitation mercurique ou absorption sur poudre de nylon*

Toujours sur ce cas des vins secs permettant le dosage direct des composés leucoanthocyaniques totaux (tabl. 1 et 2), on trouve des valeurs nettement différentes en fonction de l'agent d'isolement des tanins adopté (sulfate mercurique ou nylon), avec des modes opératoires identiques par ailleurs.

La fixation sur la poudre de polyamide expérimentée, et pour les conditions de dosage données, donne des taux de récupération faibles (13 p. 100 et 24,4 p. 100 par rapport aux dosages directs témoins) dans le cas des vins rouges (tabl. 1) ; le meilleur résultat (35,5 p. 100) est obtenu dans le cas du vin blanc (tabl. 2).

La précipitation par le réactif au sulfate mercurique donne un résultat global de 87 p. 100 et 72,5 p. 100 par rapport aux dosages directs témoins des deux échantillons de vins rouges (tabl. 1) et de 76 p. 100 dans le cas du vin blanc (tabl. 2).

Comparativement par notre méthode la quantité d'anthocyanidol dosée est en valeur absolue beaucoup plus importante ; ceci peut impliquer une meilleure séparation des leucoanthocyanes du milieu analysé.

Il faut préciser que le polyamide testé (nylon technyl Rhodiacéta) n'a peut-être pas le même pouvoir absorbant des leucoanthocyanes que celui (Divergan B. A .S. F.) préconisé par MASQUELIER (1963).

Dans des conditions d'analyses non comparables, les teneurs en leucocyanidol trouvées, sur un échantillonnage varié de vins blancs (FLANZY et AUBERT, 1969) par notre technique de précipitation, sont toutefois du même ordre de grandeur que les chiffres moyens donnés à partir de la fixation sur nylon par MASQUELIER (1963).

Les travaux de SINGLETON (1967) ont cependant montré que les polyamides et polyvinylpyrrolidones auraient un pouvoir séquestrant des leucoanthocyanes (et catéchines) peu polymérisées particulièrement important et moindre pour les tanins condensés ; c'est-à-dire une fixation incomplète des formes les plus développées (de hauts poids moléculaires).

On peut avancer que notre méthode de précipitation par le sulfate mercurique pourrait être complémentaire de celles par absorption des polyphénols sur les nylons ou P. V. P.

Ainsi le tableau 3 montre, sur l'exemple des jus de raisins, que l'écart relatif entre les deux techniques expérimentées varie considérablement avec l'échantillon analysé. Les leucoanthocyanes des jus de raisin blanc seraient-elles sous une forme plus facilement absorbable par le nylon et les jus rouges plus riches en tanins précipités par le réactif mercurique ?

C. — *Variabilité des résultats*

Sur l'ensemble des essais réalisés, la variabilité des résultats est relativement faible pour des écarts considérables sur les conditions opératoires de la précipitation des tanins. Dans des mesures précises, il sera toutefois nécessaire de déterminer les conditions optimales d'isolement des tanins selon le mode opératoire général proposé.

Le tableau 3 donne un exemple de dosages répétés sur un échantillon de vin blanc doux de *Grenache* (pour cet échantillon le chauffage en milieu butanol-chlorhydrique direct avait donné une couleur brun foncé interdisant toute évaluation des anthocyanidols formés). Sur les 6 mesures on peut donner une variabilité, sur ces essais, inférieure à 10 p. 100. La valeur à retenir sera néanmoins la plus élevée (34,3 mg/l de leucocyanidine) compte tenu des observations précédentes.

D. — *Dosage des tanins leucoanthocyaniques dans les milieux troubles ou pulpeux*

La présence de particules insolubles dans l'échantillon à analyser ne gêne en rien le dosage. Leur élimination peut intervenir dans notre mode opératoire, soit avant, soit après dissolution du précipité mercurique dans le milieu butanol-chlorhydrique.

On peut ainsi évaluer la richesse potentielle d'un milieu liquide hétérogène en tanins totaux, y compris ceux extractibles des débris de pulpe, avant la détermination de la teneur du liquide en leucoanthocyanes uniquement dissoutes.

Le tableau 3 montre, sur un échantillon de jus de prune d'Ente sirupeux et trouble, les divers résultats obtenus après une centrifugation plus ou moins poussée du milieu à des densités différentes par une dilution choisie avec de l'eau. La décantation sur le jus centrifugé puis dilué au 1/5 (mesure C) entraîne un dépôt de produits

insolubles retenant 63 p. 100 des tanins du jus uniquement centrifugé (mesure B). La centrifugation du jus brut, avant dilution (mesure C), entraîne un dépôt retenant 35 p. 100 des tanins dosés dans le jus brut initial, les autres conditions de dosage étant les mêmes (mesure D). Il est évident que le jus brut très sucré décante moins bien que le jus dilué dans de l'eau et par suite moins dense et moins visqueux. Pratiquement, toute dilution d'un jus avec de l'eau favorisera la précipitation des tanins leucoanthocyaniques parallèlement à la diminution de l'extrait sec de la suspension de pulpe.

D'autre part, l'utilisation de milieux hydroalcooliques, avec des teneurs en alcool différentes, permettrait de faire une sélection des composés phénoliques extractibles de la cellule végétale (travaux de GOLSTEIN et SWAIN, 1963).

Précisons que les valeurs rapportées sur quelques extraits de pulpe (tabl. 3) n'ont qu'une valeur indicative ; elles permettent de tester la technique proposée sans chercher une relation immédiate avec les caractères technologiques du fruit. On peut néanmoins faire quelques remarques sur ces chiffres. Les cerises rouges et les raisins noirs contiennent à la fois beaucoup de colorants anthocyaniques et également beaucoup de leucoanthocyanes. Cette particularité, notée sur deux exemples, est-elle liée au précurseur commun (flavanonol ou flavenol) des anthocyanes et leucoanthocyanes (HARBORNE, 1965), qui serait plus ou moins abondant pour une même espèce avec la variété d'un fruit ?

Les fruits du type « prunus » (prune et abricot), apparaissent relativement riches en tanins leucoanthocyaniques extractibles même dans un bon état de maturité. Par contre, la variété de pêche analysée est pauvre malgré une maturité incomplète et une astringence encore sensible. Les tanins évalués ne seraient donc pas représentatifs de ce caractère organoleptique ; ceci est un argument en faveur de la thèse qui attribue essentiellement aux tanins faiblement polymérisés le caractère astringent (GOLSTEIN et SWAIN, 1963).

La précipitation par le sulfate mercurique séparerait donc les formes les plus développées ; par exemple, celles qui peuvent être responsables de la formation des troubles dans les boissons. Ce sont là des voies de recherches intéressantes à étudier sur des cas pratiques.

CONCLUSION

La séparation des substances polyphénoliques d'un extrait végétal sous forme de précipité avec le réactif au sulfate mercurique de SÉMICHON-FLANZY offre une nouvelle voie permettant le dosage de composés leucoanthocyaniques dans des milieux très divers.

Un mode opératoire relativement simple donne les conditions optimales d'isolement et de purification des tannoïdes précipitables et un rendement de transformation en anthocyanidols acceptable ; la reproductibilité des mesures est satisfaisante.

Par cette séparation, on élimine, d'une part l'existence d' « artefacts » habituels aux milieux biologiques sucrés, d'autre part on peut extraire les débris cellulaires dans le milieu butanol-chlorhydrique où s'effectue la transformation spécifique des flavanes 3-4 diols.

La méthode peut être avantageusement comparée à la fixation des leucoanthocyanidines sur poudre de polyamide et complète également les méthodes d'extraction sélective par solvant.

Cette technique testée sur quelques vins et jus de fruits présente une valeur technologique intéressante, plus particulièrement dans l'étude des milieux pulpeux et des troubles des boissons.

Reçu pour publication en octobre 1969.

SUMMARY

A NEW TECHNIQUE FOR THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF LEUCOANTHOCYANIC TANNINS

The use of the SÉMICHON-FLANZY reagent of mercuric sulphate has made it possible to perfect a new technique for the quantitative analysis of leucoanthocyanic compounds.

The method is compared to the fixation of leucoanthocyanidins on nylon powder ; on several materials it gives better or complementary results. The selection of polyphenols is not the same in the two methods.

This procedure is particularly successful with extracts of pulped and sugared fruits.

RESUMEN

NUEVA TÉCNICA DE DOSIFICACIÓN DE LOS TANINOS LEUCOANTOCIÁNICOS

La utilización del reactivo al sulfato mercúrico de SEMICHON-FLANZI ha permitido elaborar una nueva técnica de dosificación de compuestos leucoantociánicos.

El método es comparado a la fijación de las leucoantocianidinas sobre polvo de nylon y proporciona sobre diversos materiales resultados supériores o complémentorios. La seleción de los polifenoles no es la misma en ambas vías.

Esta técnica resulta particularmente interesante en los extractos de frutas pulposas y azucaradas.

RIASSUNTO

NUOVA TECNICA DI DOSAGGIO DEI TANNINI LEUCOANTOCIANICI

L'impiego del reattivo al solfato mercuriale di SÉMICHON-FLANZY ha permesso la messa a punto di una nuova tecnica per il dosaggio dei composti leucoantocianici.

Il metodo è comparato al fissaggio dei leucoantocianidol su polvere di nylon e su diversi materiali dà dei risultati superiori o complementari ; la selezione dei polifenoli non è la stessa con i due metodi.

Questa tecnica è particolarmente interessante sugli estratti di frutta polposa e zuccherina.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

FLANZY M., AUBERT S., 1968. Méthode de purification de l'ensemble des composés phénoliques des vins. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 93-98.

FLANZY M., AUBERT S., 1969. Évaluation des composés phénoliques des vins blancs. Étude comparée de quelques vins de *Vitis vinifera* et de cépages interspécifiques producteurs directs. *Ann. Technol. agric.* **18**, 27-44.

GOLSTEIN J. L., SWAIN T., 1963. Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry*, **2**, 371-383.

GOVINDARAJAN V. S., MATHEW A. G., 1965. Anthocyanidins from leucoanthocyanidins. *Phytochemistry*, **4**, 985-988.

HASLAM E., 1966. In : *Chemistry of vegetables tannins.* Academic Press, ed. London and New York, 14-90.

LEBRETON P., JAY M., VOIRIN B., 1967. Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes. *Chim. anal.*, **49**, 375-383.

MASQUELIER J., POINT G., 1955. Les substances vitaminiques P des vins blancs : extraction et dosage. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **94**, 80-84 (Numéro spécial).

MASQUELIER J., 1956. Identification et dosage des facteurs vitaminiques P dans diverses boissons fermentées. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **38**, 65-70.

MASQUELIER J., VITTE G., ORTEGA M., 1959. Dosage colorimétrique des leucoanthocyanes dans les vins rouges. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **98**, 145-148.

MASQUELIER J., 1963. Dosage des leucoanthocyanes du vin blanc. Emploi de la poudre de polyamide. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **102**, 51-52.

MASQUELIER J., MICHAUD J., TRIAUD M^lle J., 1965. Fractionnement des leucoanthocyanes du vin. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **104**, 81-85.

MONTIES B., JACQUIN P., 1966. Valeur technologique du dosage des tanins dans les jus de pommes. *Ann. Technol. agric.*, **15**, 335-347.

NÈGRE E., 1945. *Contribution à l'étude des matières tannoïdes du vin.* Thèse, Strasbourg.

RIBÉREAU-GAYON P., STONESTREET E., 1966. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. anal.*, **48**, 188-196.

SÉMICHON L., FLANZY M., 1926. Recherches sur la défécation des liquides sucrés par les sels mercuriques. *Ann. Falsif. Fraudes*, **208**, 208-226.

SINGLETON V. L., 1967. Fining-phenolic relationships. *Wines vines*, **48**, 23-25.

SMATHERS R. V., CHARLEY H., 1967. Problems in measuring leucoanthocyanin content of pears. *J. Food Sci.*, **32**, 310-314.

SWAIN T., GEISSMAN T. A., 1962. Economic importance of flavonoïd compounds : Foodstuffs. in : *The Chemistry of flavonoïd compounds.* Pergamon Press, New York.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (4), 339-350.

OXYDATION DE L'ACÉTATE PAR *ACETOBACTER RANCENS*

C. DIVIES et P. DUPUY
avec la collaboration technique de Ch. SCHNEIDER

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de recherches de Dijon
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Les auteurs ont étudié l'oxydation de l'acétate par *Acetobacter rancens* sur une culture avec l'éthanol comme substrat carboné. Aux pH de culture de 3,5, 5,0, 6,5, si le milieu est pauvre en acides organiques ou en acides aminés, on observe un rendement moléculaire de transformation de l'éthanol en acétate de 95 p. 100. L'acétate formé peut cependant servir de substrat carboné pour *Acetobacter rancens* puisqu'on a pu suivre l'incorporation dans les bactéries de l'acétate marqué introduit dans le milieu de culture. Les bactéries prélevées aux différents stades de la culture ont montré, d'une part que l'oxydation de l'acétate présente deux pH optimaux, d'autre part que leur faculté d'oxyder l'acétate apparaît graduellement au cours de la culture.

INTRODUCTION

Depuis les travaux de VISSER'T HOOFT (1925), l'oxydation de l'acide acétique est un test important pour la classification des *Acetobacter*. FRATEUR (1950) signale qu'avec certaines souches il est difficile d'obtenir cette oxydation. DUPUY (1957) conseille d'ajouter au milieu de culture de l'acide succinique, car cet acide favorise l'oxydation de l'acétate.

On sait aussi que dans les conditions de la vinaigrerie (PASTEUR, 1868) et dans les cultures à pH = 7 (DUPUY, 1958) les bactéries acétiques oxydent l'acétate lorsque l'alcool a complètement disparu du milieu. MAUGENET (1962) a montré que la plupart des souches oxydent l'acétate à la fois en milieu neutre et en milieu acide ; cependant quelques-unes ne l'oxydent que lorsque le test est fait en milieu neutre et d'autres lorsqu'il est fait en milieu acide. Il nous a semblé intéressant de reprendre ces études, afin de voir quelle est l'action de l'éthanol sur l'oxydation de l'acétate en fonction du pH de culture et de déterminer sur des cellules non proliférantes quel est le pH optimal de l'oxydation de l'acétate.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES UTILISÉS

Nous avons utilisé une souche du groupe Oxydans, *Acetobacter rancens* var. *Saccharovorans* B 291, isolée d'un cidre doux (MAUGENET, 1962).

Le milieu de culture de base, stérilisé 20 minutes à 110°C, avait la composition suivante :

KH_2PO_4	13,6 g
$(NH_4)_2SO_4$	2 g
Solution de sels minéraux de SKEGGS et WRIGHT	5 ml
Extrait de levures (Difco)	1 g

Eau, quantité suffisante pour 1 litre

La solution de SKEGGS et WRIGHT contient :

$MgSO_4$, 7 H_2O	40 g
$MnSO_4$, 4 H_2O	2 g
$FeCl_3$	0,4 g
HCl pur	1 ml

Eau, quantité suffisante pour 1 litre.

Les substrats carbonés, éthanol ou acide acétique, qui sont déjà stériles sous la forme commerciale, sont ajoutés après la stérilisation.

Le pH du milieu a été ajusté au pH de culture et maintenu constant au cours de la culture par des additions soit de NaOH, soit de H_2SO_4 concentré.

Les fioles de la culture sont placées sur un agitateur horizontal de type rotatif tournant à 240 tours/mn, le rapport entre le volume total du flacon et le volume du liquide est de 10. Dans ces conditions, le coefficient d'oxygénation mesuré dans une solution de sulfite est de 38 mmoles d'O_2 par litre et par heure (SCHULTZ et GADEN, 1956).

L'alcool a été dosé après distillation par oxydation chromique. L'acide acétique, après entraînement par la vapeur, a été dosé par acidimétrie. Pour préparer les cellules non proliférantes, les bactéries sont d'abord refroidies dans la glace fondante en maintenant l'agitation au moyen d'un barreau magnétique. Ensuite elles sont centrifugées au froid, lavées et reprises dans de l'eau physiologique.

La respiration a été étudiée par la méthode manométrique de WARBURG à 30°C dans l'heure suivant la récolte, car on sait que les bactéries perdent rapidement leur faculté d'oxyder l'acétate (DUPUY, 1958).

Les déterminations du poids sec (exprimé en mg/ml) des suspensions bactériennes ont été effectuées par néphélométrie après avoir établi la correspondance densité optique-poids sec.

Dans une culture nous avons utilisé l'acétate 1-^{14}C. Dans 100 ml de culture on a introduit 10 µmoles d'acétate d'activité spécifique 1,29 mCi/mM. Les comptages en d.p.m. pour la radioactivité du milieu et des bactéries ont été effectués au spectromètre à scintillation liquide « Tricarb » (Packard). La prise d'essai est filtrée à travers une membrane millipore H. A. 0,45 µ. Les bactéries recueillies sur le filtre sont ensuite lavées à l'acide trichloracétique 5 p. 100. Le filtre séché dans l'étuve à 60°C est directement placé dans le fond des fioles de comptage en le recouvrant de 1,4 ml de liquide scintillant. Dans ces conditions, le rendement de comptage de la radioactivité fixée par la masse bactérienne est de 50 p. 100. La radioactivité du milieu a été mesurée après filtration sur filtre millipore. Nous avons distingué la fraction de carbone marqué entraînable à la vapeur d'eau et la fraction restant dans le résidu de distillation. Le liquide scintillant utilisé a la composition suivante : 10 ml de toluène, 50 mg de 2-5-diphényloxazole, 3 mg de 1,4-*bis*-2 (4-méthyl-5-phényloxazolyl)-benzène, 9 ml d'éthanol, ce qui permet de pouvoir introduire 1 ml de solution aqueuse par fiole de comptage.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. *Métabolisme de l'acétate pendant la culture avec l'éthanol comme premier substrat carboné*

Nous avons réalisé trois cultures au pH de 3,5, 5,0, 6,5 (fig. 1, 2, 3) avec des concentrations respectives d'éthanol de $15 \cdot 10^{-2}$M, $5{,}6 \cdot 10^{-2}$M, $5{,}4 \cdot 10^{-2}$M. On a observé

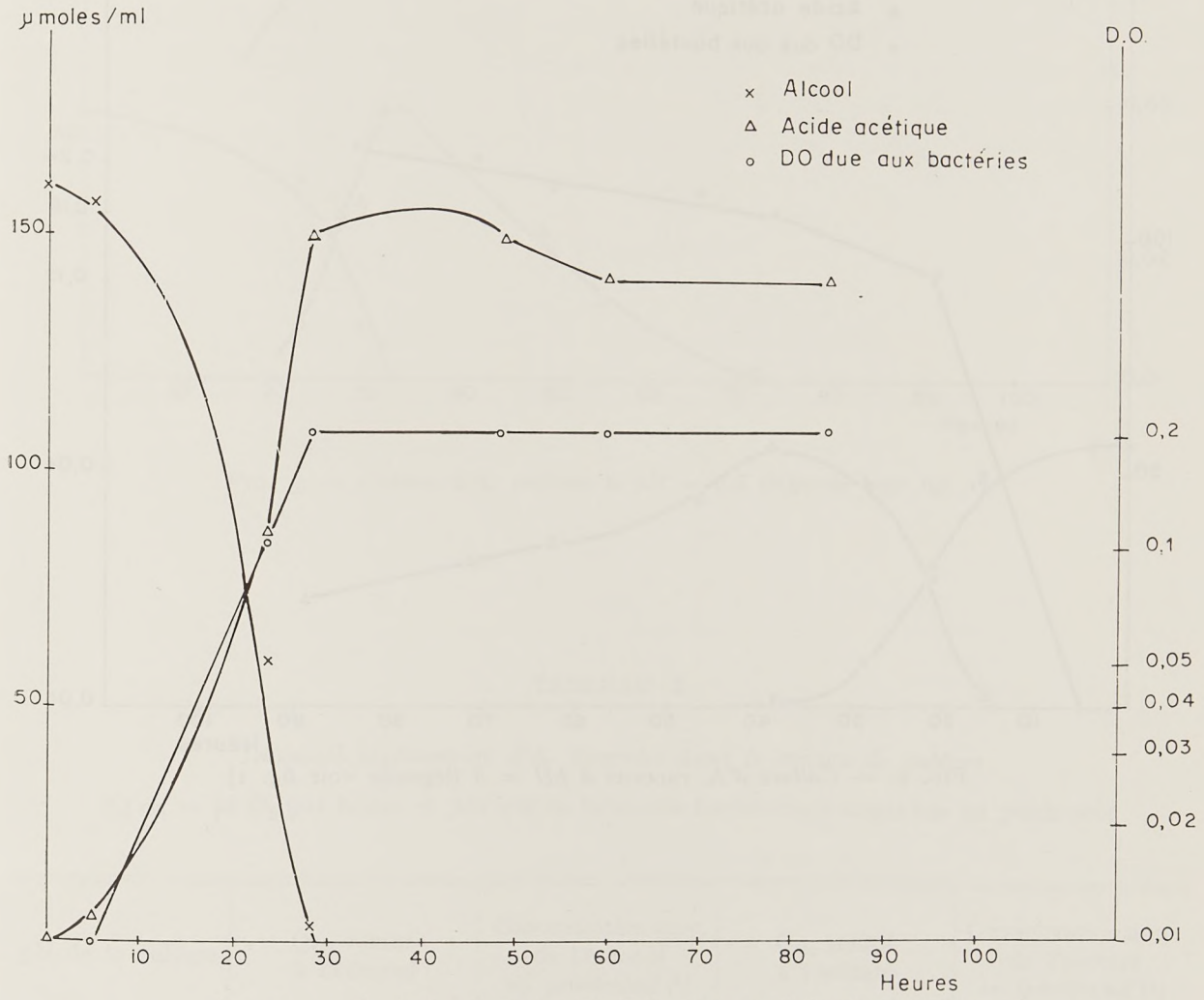


FIG. 1. — *Évolution de l'éthanol, de l'acétate et de la densité optique au cours d'une culture d'*A. rancens *à pH = 3,5*

dans les trois cas qu'à un moment donné de la culture, l'éthanol a été entièrement transformé en acide acétique à 5 p. 100 près.

Le taux de croissance sur l'éthanol est maximal à pH = 5 et est égal à 0,29 ; il est sensiblement le même à pH = 3,5 et à pH = 6,5 : respectivement 0,12 et 0,14. Le taux de croissance au cours de la suroxydation de l'éthanol est de 0,009 à pH = 5

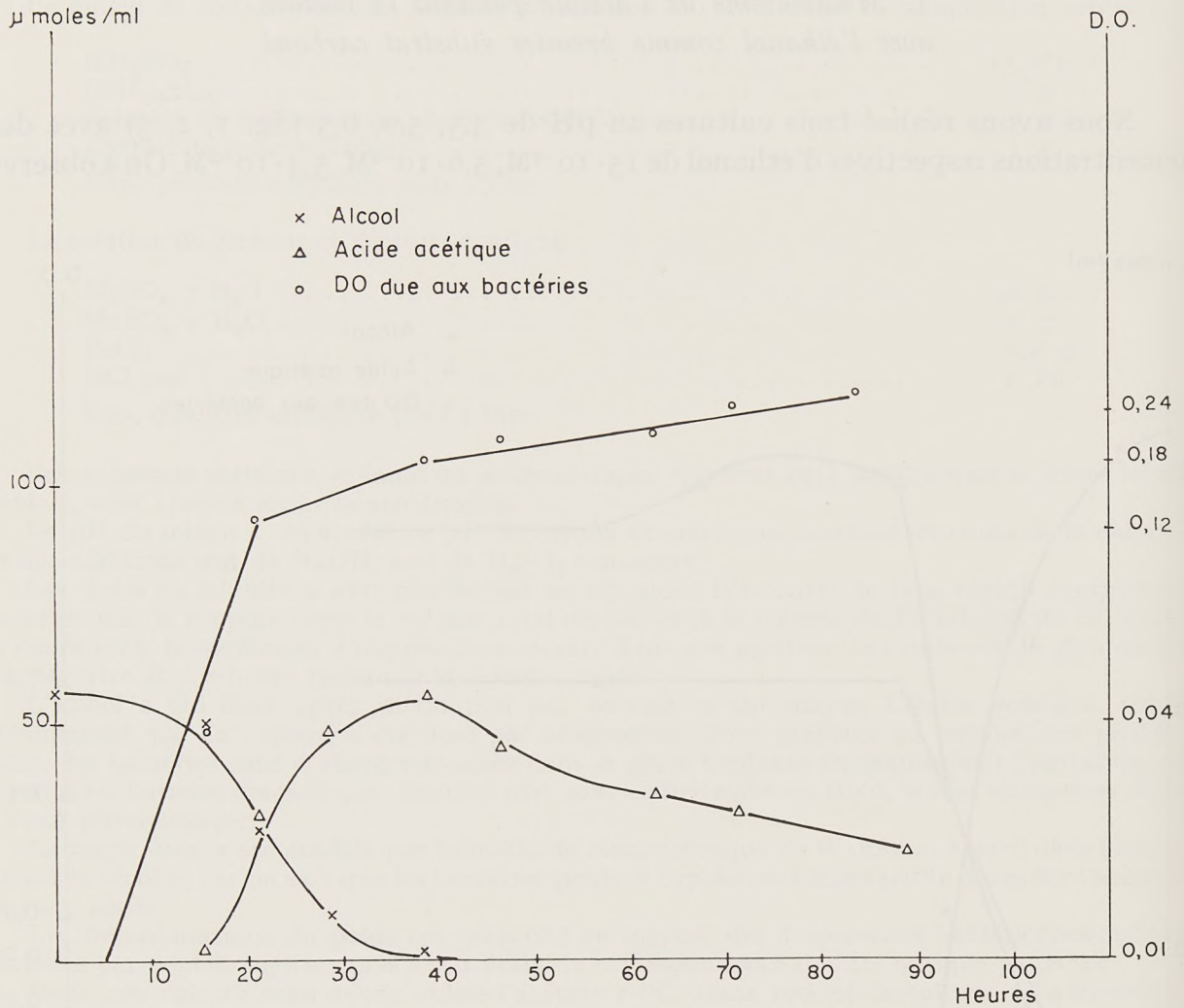


FIG. 2. — *Culture d'*A. rancens *à pH = 5* (légende voir fig. 1)

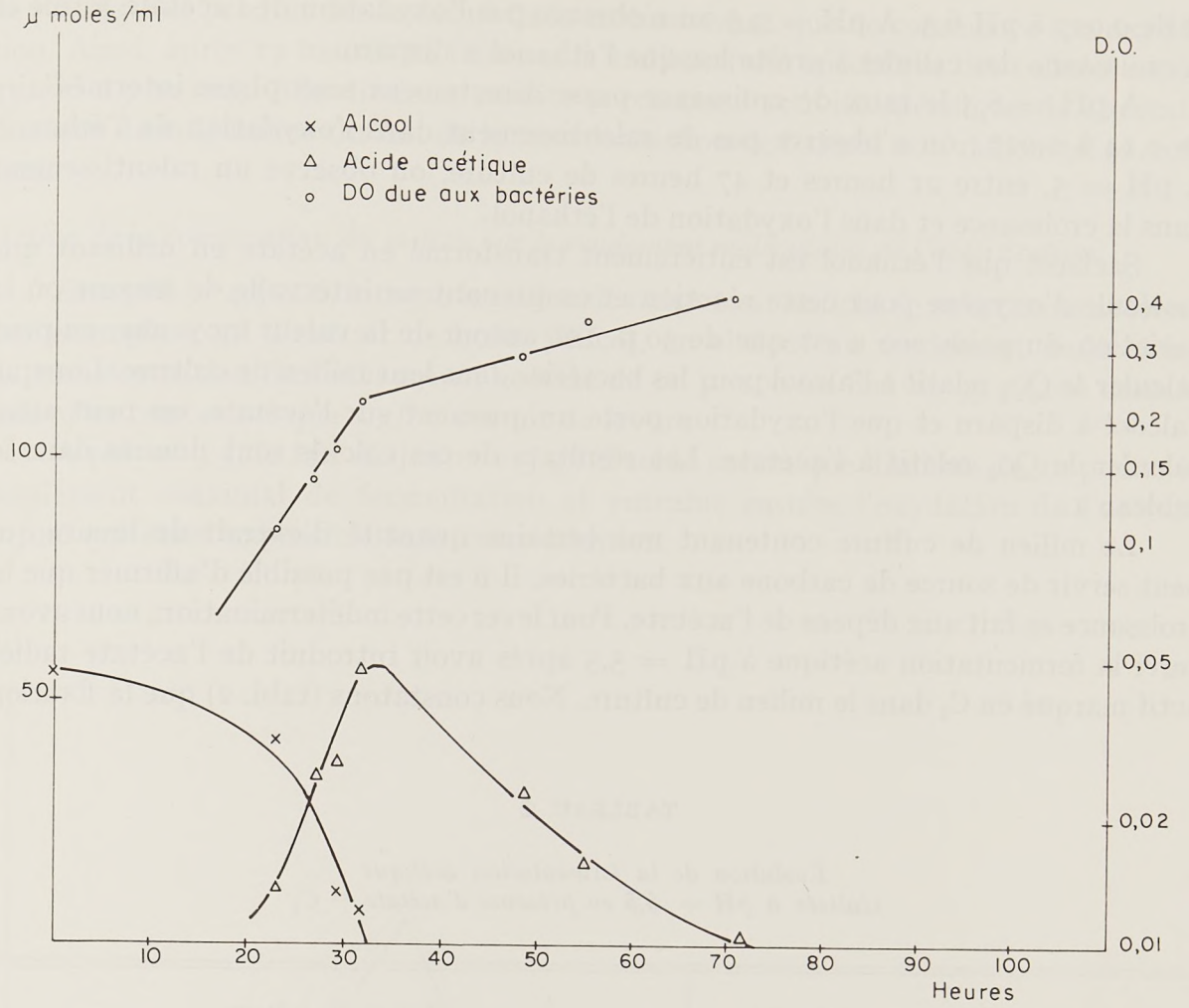


FIG. 3. — *Culture d'*A. rancens *à pH = 6,5* (légende voir fig. 1)

TABLEAU I

*Intensité respiratoire d'*A. rancens *dans le milieu de culture*

(Q_{O2} = µl O_2 par heure et par mg de la masse bactérienne exprimée en poids sec)

pH de la culture	Q_{O_2} relatif à l'éthanol	Concentration moy. de l'éthanol en µmoles/ml (1)	Q_{O_2} relatif à l'acétate	Concentration moy. de l'acétate en µmoles/ml (1)
3,5	2 080	110	0	140
5	1 500	45	150	33
6,5	980	33	390	27

(1) Concentration moyenne du substrat correspondant à la période qui a servi à la mesure des Q_{O_2}.

et de 0,027 à pH 6,5. A pH = 3,5 on n'observe pas l'oxydation de l'acétate formé et la croissance des cellules s'arrête lorsque l'éthanol a disparu.

A pH = 6,5 le taux de croissance passe directement sans phase intermédiaire de 0,14 à 0,027 ; on n'observe pas de ralentissement dans l'oxydation de l'éthanol. A pH = 5, entre 21 heures et 47 heures de culture, on observe un ralentissement dans la croissance et dans l'oxydation de l'éthanol.

Sachant que l'éthanol est entièrement transformé en acétate en utilisant une molécule d'oxygène pour cette réaction et en prenant un intervalle de mesure où la variation du poids sec n'est que de 30 p. 100 autour de la valeur moyenne, on peut calculer le Qo_2 relatif à l'alcool pour les bactéries dans leur milieu de culture. Lorsque l'alcool a disparu et que l'oxydation porte uniquement sur l'acétate, on peut aussi calculer le Qo_2 relatif à l'acétate. Les résultats de ces calculs sont donnés dans le tableau 1.

Le milieu de culture contenant une certaine quantité d'extrait de levure qui peut servir de source de carbone aux bactéries, il n'est pas possible d'affirmer que la croissance se fait aux dépens de l'acétate. Pour lever cette indétermination, nous avons suivi la fermentation acétique à pH = 5,5 après avoir introduit de l'acétate radioactif marqué en C_1 dans le milieu de culture. Nous constatons (tabl. 2) que la fixation

TABLEAU 2

Évolution de la fermentation acétique réalisée à pH = 5,5 en présence d'acétate $^{14}C_1$

	Temps de culture				
	0	17 h	40 h	45 h	64 h
Éthanol en µmoles/ml	82	79	< 2	< 2	< 2
Acétate en µmoles/ml	0,1	1	71	65	39
Radioactivité du milieu filtré en d.p.m./ml	288 000	286 000	268 000	240 000	145 000
Radioactivité du milieu sous forme d'acides volatils en d.p.m./ml	288 000	228 000	219 000	200 000	118 000
Radioactivité du milieu dans le résidu de distillation en d.p.m./ml		31 000	15 200	24 000	21 600
p. 100 de la radioactivité du milieu récupérée dans l'acidité volatile et dans le résidu de distillation		90,6	87,5	93,5	96,5
Radioactivité fixée par les bactéries et par ml de milieu en d.p.m./ml		835	7 250	7 650	10 100
Poids sec de la masse bactérienne en mg/ml		0,025	0,315	0,33	0,41
Activité spécifique des bactéries en d.p.m./mg		33 400	23 000	23 200	24 600

de l'acétate se produit dès le début de la culture avant que ne commence son oxydation. Ainsi, après 17 heures de culture, la radioactivité spécifique des cellules est de 33 400 d.p.m./mg. Elle diminue ensuite parce que l'activité spécifique de l'acétate diminue dans le milieu du fait de la transformation de l'alcool non radioactif en acétate.

Action de la composition du milieu sur le rendement moléculaire de l'acétification.

Aux pH = 4,5 et 6, lorsque le milieu de culture est enrichi en substances azotées, par exemple 4 g/l d'extrait de bœuf (Difco), on obtient un rendement moléculaire de transformation de l'éthanol en acétate de 60 p. 100 au lieu de 95 p. 100 dans le milieu ne contenant que 1 g/l d'extrait de levure.

A pH = 3,5, le fait d'ajouter 0,3 g/l d'acide succinique diminue de 10 p. 100 le rendement maximal de fermentation et entraîne ensuite l'oxydation de l'acétate formé qui était impossible sans cette addition.

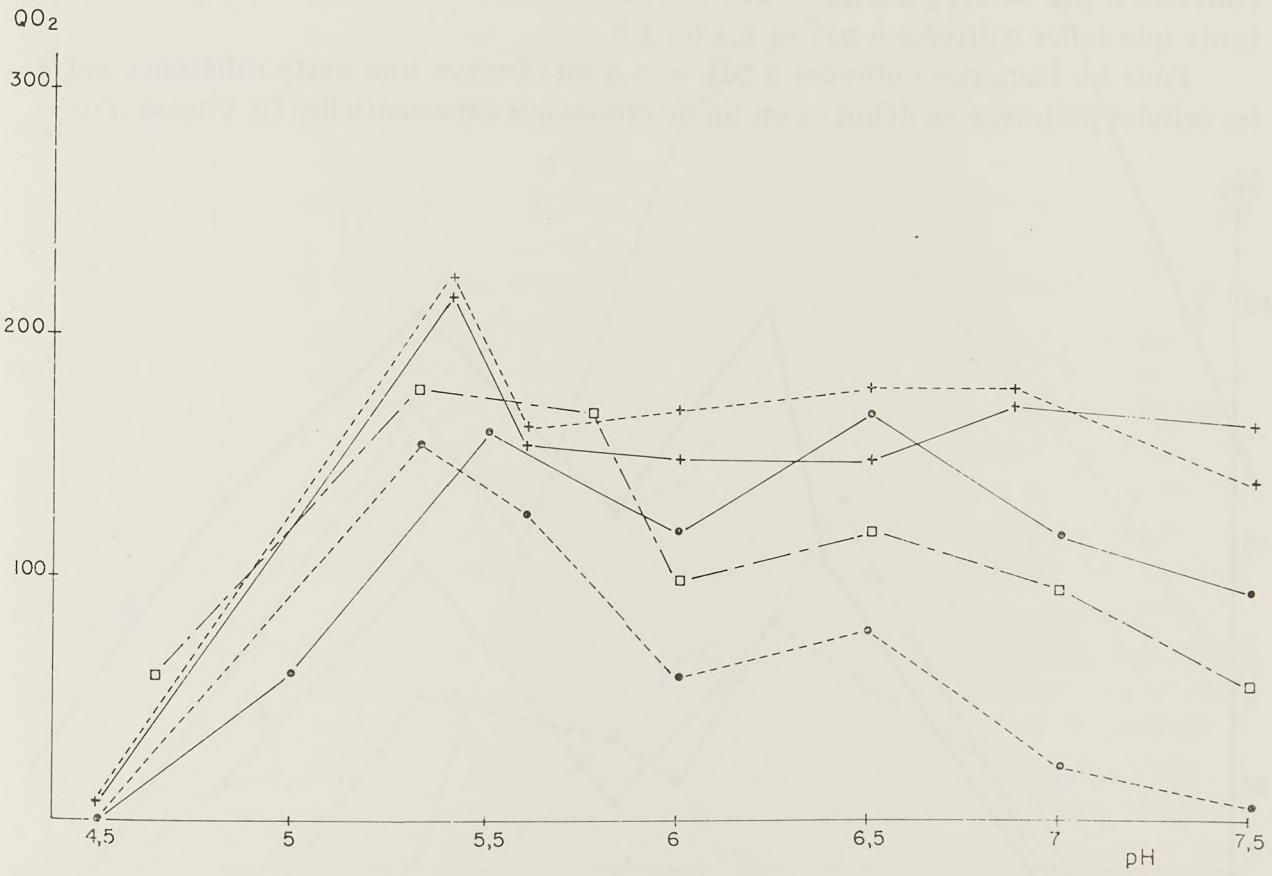


FIG. 4. — *Vitesse d'oxydation de l'acétate en fonction du pH par des cellules non proliférantes obtenues de cultures sur acétate* (60 mmol/l)

pH de culture 3,8 : □ –.–. Récolte à 0,15 mg/ml de poids sec

pH de culture 5,4 : ● —— Récolte à 0,25 mg/ml de poids sec ; ● – – – Récolte à 0,13 mg/ml de poids sec

pH de culture 6,5 : + —— Récolte à 0,20 mg/ml de poids sec ; + – – – Récolte à 0,05 mg/ml de poids sec

Les résultats sont exprimés en µl O_2 consommés par heure à 30°C et pour un mg de poids sec (Qo_2). Acétate à la concentration de 0,05 M. Tampon tartrate phosphate 0,1 M de pH = 4 à 7. Tampon phosphate 0,1 M à pH = 3,5-7,5.

2. *L'oxydation de l'acétate par les cellules non proliférantes*

Afin d'avoir une mesure du système enzymatique d'oxydation de l'acétate formé dans les cellules, nous avons déterminé la vitesse d'oxydation de l'acétate par des cellules non proliférantes prélevées aux différents stades de la culture. Ces mesures ont été effectuées pour une concentration d'acétate de 0,05 M. Pour cette concentration, en effet, la vitesse d'oxydation est constante au cours de la première heure. Pour des concentrations supérieures, on observe une vitesse décroissante au cours des mesures.

a) *Bactéries cultivées sur acétate.*

La figure 4 reproduit l'activité pour l'oxydation de l'acétate des bactéries cultivées aux pH 3,8, 5,4 et 6,5 et récoltées à diverses phases de la culture. L'examen des courbes de la figure 4 montre, dans tous les cas, une activité d'oxydation présentant deux maximums : l'un à pH = 5-5,5 et l'autre à pH = 6,5-7. Les bactéries cultivées à pH = 6,5 présentent une oxydation de l'acétate à pH = 7 plus importante que celles cultivées à pH = 5,4 ou 3,8.

Pour les bactéries cultivées à pH = 5,4 on observe une nette différence entre les cellules prélevées en début et en fin de croissance exponentielle. La vitesse d'oxy-

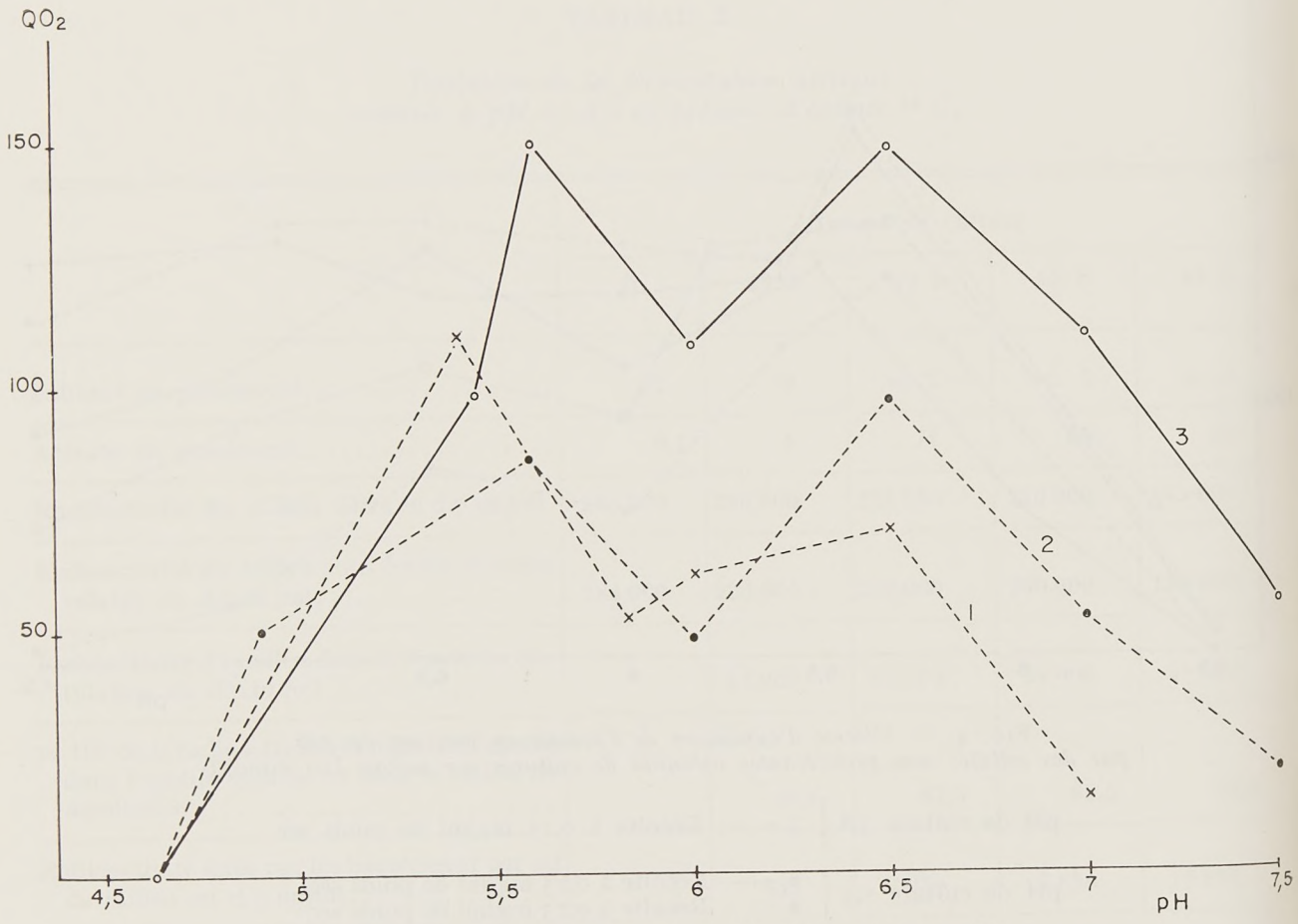


Fig. 5. — *Vitesse d'oxydation de l'acétate en fonction du pH par des suspensions bactériennes prélevées au cours de leur croissance sur éthanol à pH = 5*

Courbes 1 et 2. L'éthanol est présent dans le milieu de culture { courbe 1 : Récolte à 0,05 mg/ml de poids sec ; courbe 2 : Récolte à 0,12 mg/ml de poids sec

Courbe 3. L'éthanol n'est plus présent dans le milieu de culture. Récolte à 0,19 mg/ml de poids sec. Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience de la figure 4.

dation à pH = 6,5 est plus importante chez les bactéries prélevées en fin de croissance exponentielle.

b) *Bactéries cultivées sur éthanol.*

Lorsque les bactéries sont cultivées sur éthanol, elles se trouvent aussi en présence d'acétate. Les résultats sont cependant différents de ceux obtenus avec les bactéries cultivées en présence d'acétate seul.

On constate pour la culture faite à pH = 5 (fig. 5) que le système enzymatique oxydant l'acétate est plus actif en fin de culture qu'au début. Les bactéries cultivées à pH = 6,5 et récoltées alors que le milieu contient encore de l'alcool ne présentent qu'un maximum d'oxydation pour ce substrat (fig. 6).

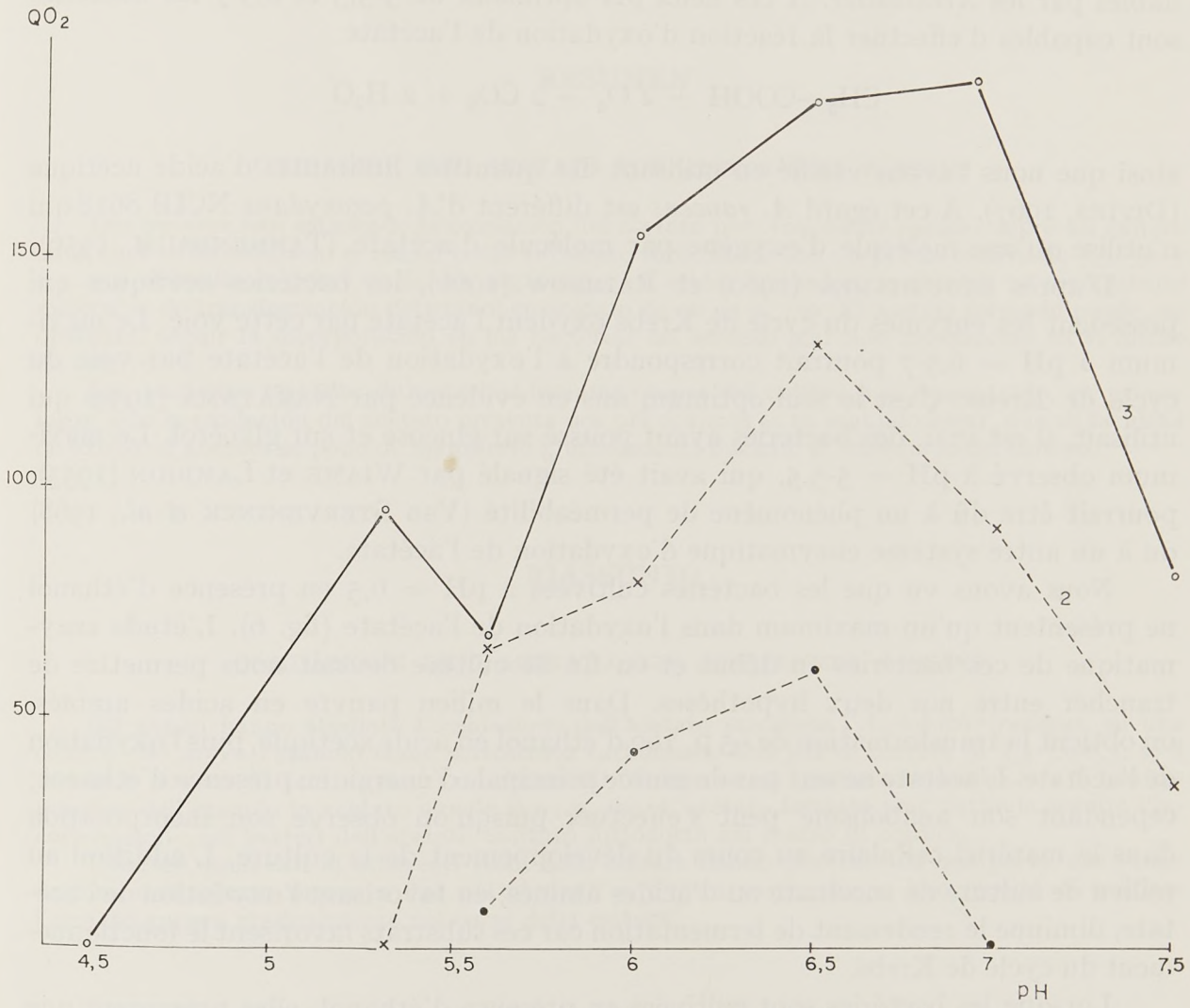


FIG. 6. — *Vitesse d'oxydation de l'acétate en fonction du pH par des suspensions bactériennes prélevées au cours de leur croissance sur éthanol à pH = 6,5*

Courbes 1 et 2. L'éthanol est présent dans le milieu de culture { courbe 1 : Récolte à 0,06 mg/ml de poids sec ; courbe 2 : Récolte à 0,11 mg/ml de poids sec

Courbe 3. L'éthanol n'est plus présent dans le milieu de culture. Récolte à 0,18 mg/ml de poids sec.

Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience de la figure 4.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Si l'on considère les résultats obtenus avec les cellules non proliférantes, il est indispensable de remarquer que l'activité oxydante mesurée est plus faible que celle qui existait dans les cultures (tabl. 1). Ceci est particulièrement gênant pour l'interprétation de l'état enzymatique des bactéries, car on n'est pas sûr que tous les systèmes impliqués dans cette oxydation soient réduits dans la même proportion.

On constate, après DUPUY et MAUGENET (1963), que l'oxydation de l'acétate présente deux pH optimaux, comme d'ailleurs celle de la plupart des substrats oxydables par les *Acetobacter*. A ces deux pH optimaux de 5-5,5 et 6,5-7 les bactéries sont capables d'effectuer la réaction d'oxydation de l'acétate :

$$CH_3—COOH + 2\ O_2 \rightarrow 2\ CO_2 + 2\ H_2O$$

ainsi que nous l'avons vérifié en utilisant des quantités limitantes d'acide acétique (DIVIES, 1967). A cet égard *A. rancens* est différent d'*A. peroxydans* NCIB 8618 qui n'utilise qu'une molécule d'oxygène par molécule d'acétate (TANNENBAUM, 1956).

D'après STOUTHAMER (1960) et RAIMBOW (1966), les bactéries acétiques qui possèdent les enzymes du cycle de Krebs oxydent l'acétate par cette voie. Le maximum à pH = 6,5-7 pourrait correspondre à l'oxydation de l'acétate par voie du cycle de Krebs. C'est le seul optimum mis en évidence par NAKAYAMA (1959) qui utilisait, il est vrai, des bactéries ayant poussé sur glucose et sur glycérol. Le maximum observé à pH = 5-5,5, qui avait été signalé par WIAME et LAMBION (1953), pourrait être dû à un phénomène de perméabilité (Van STERVENINCK *et al.*, 1968) ou à un autre système enzymatique d'oxydation de l'acétate.

Nous avons vu que les bactéries cultivées à pH = 6,5 en présence d'éthanol ne présentent qu'un maximum dans l'oxydation de l'acétate (fig. 6). L'étude enzymatique de ces bactéries en début et en fin de culture devrait nous permettre de trancher entre nos deux hypothèses. Dans le milieu pauvre en acides aminés, on obtient la transformation de 95 p. 100 d'éthanol en acide acétique, puis l'oxydation de l'acétate. L'acétate ne sert pas de source principale d'énergie en présence d'éthanol ; cependant son anabolisme peut s'effectuer puisqu'on observe son incorporation dans le matériel cellulaire au cours du développement de la culture. L'addition au milieu de culture de succinate ou d'acides aminés, en favorisant l'oxydation de l'acétate, diminue le rendement de fermentation car ces substrats favorisent le fonctionnement du cycle de Krebs.

Lorsque les bactéries sont cultivées en présence d'éthanol, elles présentent une activité d'oxydation de l'acétate bien inférieure aux cellules cultivées en présence d'acétate. Cette différence est plus marquée lorsque le pH de culture est de 6,5 au lieu de pH = 5. A pH = 3,5 les cellules sont incapables d'oxyder l'acétate, c'est pourquoi nous pensons que l'éthanol entraîne la répression d'un ou plusieurs enzymes participant à cette oxydation.

Reçu pour publication en octobre 1969.

SUMMARY

OXIDATION OF ACETATE BY *ACETOBACTER RANCENS*

The authors studied the oxidation of acetate by *Acetobacter rancens* in a medium containing ethanol as the principal carbon source. At a pH of 3,5, 5,0 or 6,5, 95 p. 100 of the ethanol was oxidized to acetate if the medium was low in organic and amino acids. The acetate formed can, however, serve as a carbon source as evidenced by the ability of the bacteria to incorporate radioactive acetate introduced into the medium. By periodically removing bacteria from the cultures, it was possible to demonstrate that, first, the oxidation of the acetate exhibited two pH optimum, and secondly, the ability of the bacteria to oxidize the acetate developed gradually in the culture.

RESUMEN

OXIDACION DEL ACETATO POR *ACETOBACTER RANCENS*

Los autores han estudiado la oxidación del acetato por *Acetobacter rancens* sobre un cultivo en el cual se ha utilizado el etanol como substrato carbonado. Con un pH de cultivo de 3,5, 5,0 y 6,5, y si el medio es pobre en ácidos orgánicos o en ácidos aminados, se observa un rendimiento molecular de transformación del etanol en acetato de un 95 p. 100. El acetato formado puede, no obstante, seguir la incorporación en las bacterias del acetato marcado introducido en el medio de cultivo.

Las bacterias tomadas durante las distintas etapas del cultivo han demostrado, en primer lugar, que la oxidación del acetato presenta dos pH óptimos y, en segundo lugar, que su facultad de oxidar al acetato se pone de manifiesto gradualmente durante el transcurso del cultivo.

RIASSUNTO

OSSIDAZIONE DELL'ACETATO CON *ACETOBACTER RANCENS*

Gli autori hanno studiato l'ossidazione dell'acetato mediante l'*Acetobacter rancens*, su una coltura che areva l'etanolo come sottostrato carbonioso. Con pH di coltura di 3,5-5,0-6,5, se il mezzo è povero di acidi organici o aminoacidi, si osserva un rendimento molecolare di trasformazione dell'etanolo in acetato uguale al 95 p. 100. L'acetato formato puo' tuttavia seguire l'incorporazione nei batteri dell'acetato trattato introdotto nel mezzo di coltura.

I batteri prelevati ai differenti stadi della coltura hanno mostrato da une parte, che l'ossidazione dell'acetato presenta due pH ottimali e, d'altra parte, che la loro facoltá di ossidare l'acetato appare gradualmente nel corso della coltura.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DIVIES C., 1967. *Comportement* d'A. rancens *en présence d'acétate*. D. E. S. Faculté des Sciences d'Orsay.

DUPUY P., 1957. Les *Acetobacter* du vin. Identification de quelques souches. *Ann. Technol. agric.*, **6**, 217-233.

DUPUY P., 1958. Les conditions d'oxydation de l'acide acétique par *A. rancens*. *Ann. Technol. agric.*, **7**, 367-375.

DUPUY P., MAUGENET J., 1963. Métabolisme de l'acide lactique par *A. rancens*. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 5-14.

FRATEUR J., 1950. Essai sur la systématique des *Acetobacter*. *La Cellule*, **53**, 287.

MAUGENET J., 1962. Les *Acetobacter* du cidre. Identification de quelques souches. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 45-53.

NAKAYAMA T., 1959. Studies on acetic acid bacteria. I. Biochemical studies in ethanol oxydation. *J. Biochem.*, Tokyo, **46**, 1217-1225.

PASTEUR L., 1868. *Études sur le vinaigre. Œuvre III*, Masson Paris, 1922.

RAIMBOW C., 1966. Nutrition and metabolism of acetic bacteria. *Wallerstein Lab. Communic.*, **98**, 5-15.

SCHULTZ J. S., GADEN L., 1956. Sulfite oxidation as a measure of aeration effectiveness. *Industr. engng. Chem.*, **48**, 2209-2212.

STOUTHAMER A. H., 1960. *Koohlhydraatstofursseling van de Azynzurbacterien*. Thesis, Univ. Utrecht.

TANENBAUM S. W., 1956. The metabolism of *A. peroxydans*. I. — Oxydative enzymes. *Biochem. biophys. Acta*, **21**, 335-342.

VAN STERVENINCK J., DAWSON E. L., 1968. Active and passive galactose transport in yeast. *Biochim. biophys. Acta*, **150**, 47-55.

VISSER'T HOOF, 1925. Biochemische anderzvekinger over hit geslacht *Acetobacter*. Diss. Delft. cité par FRATEUR (1950).

WIAME J., LAMBION R., 1951. La culture pure en vinaigrerie type rapide. *Bull. tech. Vinaigrerie*, **7**, 205-207.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (4), 351-358.

ACTION COMBINÉE DE L'ACIDE SORBIQUE ET DE L'IRRADIATION GAMMA SUR LA SURVIE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AYANT DIFFÉRENTES TENEURS EN ERGOSTÉROL

J. DUCLOS et P. DUPUY

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches de Dijon
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

On a montré, en utilisant des suspensions non proliférantes de *Saccharomyces cerevisiae*, à pH 3,4, que l'acide sorbique n'est pas un sensibilisateur aux radiations ionisantes. Il diffère donc d'autres additifs alimentaires tels que l'acide sulfureux et le pyrocarbonate d'éthyle qui dans les mêmes conditions se sont montrés sensibilisants. La présence d'ergostérol n'interfère pas avec l'action inhibitrice de l'acide sorbique.

INTRODUCTION

L'acide sorbique est utilisé depuis quelques années comme antifongique pour la conservation des denrées alimentaires. Selon Whitaker (1959) son action antifongique serait due à une inhibition des enzymes à SH. Or, beaucoup de substances se combinant aux fonctions thiols sont susceptibles de sensibiliser les microorganismes à l'action létale des radiations. C'est ainsi qu'on a pu montrer que les levures étaient sensibilisées par l'iodoacétamide, l'acide sulfureux et le pyrocarbonate d'éthyle (Dupuy et Trémeau, 1964, 1966, 1967).

Lampen *et al.* (1957, 1959, 1960), Umezawa (1964), Zygmunt et Tavormina (1966) ont montré que l'action fongistatique des antibiotiques à polyène de structure *trans* (nystatine, filipine,...) était provoquée par la liaison de ces composés avec les stérols de la membrane cellulaire. Cette réaction entraîne d'ailleurs une altération de la perméabilité de la membrane qui peut être mise en évidence par la libération des acides aminés du pool. La conséquence de ces phénomènes est que l'addition de

divers stérols au milieu d'incubation protège les cellules de l'effet de ces antibiotiques. On peut penser que l'acide sorbique qui est également un polyène de structure *trans* se comporte de la même façon que ces antibiotiques. Ceci expliquerait entre autre que l'acide sorbique n'agisse pas sur les bactéries qui sont dépourvues de stérols.

Le présent travail a les deux objectifs suivants. En partant des résultats de WHITAKER on a recherché si l'acide sorbique sensibilisait les levures à l'action des radiations ionisantes, comme c'est le cas pour la plupart des réactifs des thiols. En partant des résultats de LAMPEN *et al.*, on a étudié comment l'ergostérol pouvait interférer sur l'action fongistatique de l'acide sorbique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — *Dosage de l'acide sorbique*

L'acide sorbique commercial « Rhône-Poulenc » a été préalablement purifié par une recristallisation dans l'eau. Nous avons testé la pureté du produit par la détermination de quelques constantes physiques. Les valeurs trouvées pour le coefficient de distillation (k = 0,58) et pour l'intervalle de fusion (F = 132-134°C) correspondent à celles de l'isomère *trans-trans* de l'acide hexadiène-2,4 oïque-1. Le spectre d'absorption dans l'UV présente un maximum à 256 mμ. La forme de ce spectre permet de se rendre compte de l'absence de produits de décomposition de l'acide sorbique qui absorbent à 225 mμ.

La destruction de l'acide sorbique qui se produit au cours de l'irradiation a été suivie par dosage spectrophotométrique. L'appareil utilisé fut le spectrophotomètre Spectronic 505 de Baush et Lomb. On détermine la densité optique à 256 mμ par rapport à une solution de référence. Toutes ces déterminations sont faites dans la soude 0,01 N.

B. — *Irradiation et détermination de la survie*

Les conditions de culture et les techniques microbiologiques employées pour les essais de radiosensibilisation ont été décrites dans une publication antérieure concernant la sensibilisation de la même souche de levure (*Saccharomyces cerevisiae*, S 132) par l'iodoacétamide (DUPUY et TRÉMEAU, 1966). Les levures qui ont servi à mesurer la survie proviennent de cultures agitées pendant 24 heures et sont ensuite préparées en suspension non proliférante dans du tampon citrate-phosphate pH 3,4. Avant l'irradiation, les levures sont incubées pendant 1 à 3 heures à 0°C avec les solutions d'acide sorbique. Des doses comprises entre 100 et 500 mg/l d'acide sorbique ont été utilisées. Les suspensions soumises à l'irradiation renfermaient environ $2 \cdot 10^6$ cellules par ml.

L'irradiateur est constitué par une source de ^{60}Co fournissant au moment des expériences un débit de dose de 1,3 krad/mn. Les suspensions de levures en présence d'acide sorbique sont irradiées en ampoules ouvertes de 3 ml maintenues à 0°C, à des doses variant de 50 à 400 krad.

Après irradiation, on dénombre les cellules survivantes, c'est-à-dire celles capables de se développer en colonies. Pour cela les suspensions sont diluées convenablement dans le tampon phosphate 0,02 M de pH 6,6 puis ensemencées en boîte de Petri dans un milieu gélosé ayant la composition suivante : glucose 5 g, extrait de levure 5 g, agar 18 g pour un litre. Le comptage des colonies est effectué après 3 à 4 jours d'incubation à 30°C.

C. — *Mesure de la croissance*

L'influence de l'ergostérol sur l'action de l'acide sorbique est toujours étudiée sur la même souche de levure (*Saccharomyces cerevisiae*, S. 132). Le milieu de culture tamponné à pH 3,4 a la composition suivante : glucose 5 g, extrait de levure 3 g, solution de Skeggs and Wright 10 ml pour 1 litre. La croissance des levures en présence d'acide sorbique et d'ergostérol est mesurée par l'augmentation de la densité optique de la culture à 560 mμ.

D. — *Exsorption des acides aminés*

L'altération de la perméabilité des parois cellulaires par l'acide sorbique en présence ou non d'ergostérol est suivie par la mesure de l'exsorption des acides aminés du pool. Nous nous sommes inspirés de la méthode décrite par MORFAUX et DUPUY (1966).

La culture des levures s'effectue dans un milieu Malt Wickerham de composition suivante : malt 3 g, extrait de levure 3 g, peptone pancréatique 5 g, glucose 10 g, pour 1 litre, tamponné à pH 3,4 (tampon citrate-phosphate de Mac Ilvaine). Le milieu ensemencé est placé à 28°C sur un agitateur rotatif. Après 48 heures de développement, les cellules sont récoltées par centrifugation (6 mn. à 6 000 t/min.), lavées 2 fois à l'eau distillée puis remises en suspension dans le même tampon et à la même température, en présence d'acide sorbique et d'ergostérol. Des prélèvements sont effectués en fonction du temps. Les levures sont éliminées par centrifugation (7 min. à 14 000 t/min.). Les acides aminés libérés dans le tampon au cours de l'exsorption sont dosés globalement par la méthode de dosage colorimétrique à la ninhydrine de MOORE et STEIN (1954), à 570 mμ.

Pour l'obtention de cellules appauvries en stérols nous avons cultivé la souche sur le même milieu en anaérobiose. La fiole ensemencée après barbotage d'azote est bouchée avec un tube de garde et placée à 28°C. La récolte se fait au bout de 3 jours à partir d'un volume plus important de culture.

RÉSULTATS

A. — *Destruction de l'acide sorbique au cours de l'irradiation*

En ampoules ouvertes de 3 ml maintenues à 0°C à pH 3,4 on constate une destruction proportionnelle à la dose (fig. 1). Dans les expériences de sensibilisation, l'acide sorbique va donc disparaître progressivement lorsque les levures seront soumises à l'irradiation.

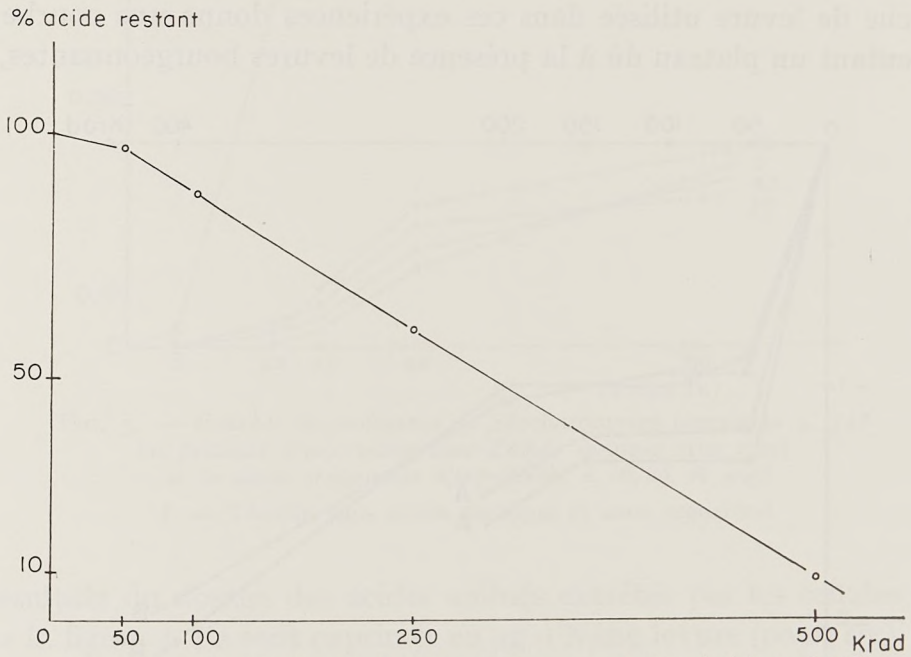


FIG. 1. — *Destruction de l'acide sorbique en solution à 0,3 p. 1 000 au cours de l'irradiation γ, à pH 3,4*

B. — *Survie des levures*

Trois essais ont été effectués en augmentant chaque fois la quantité d'acide sorbique, la durée d'incubation et en donnant diverses doses d'irradiation. Les résultats

sont rapportés dans le tableau I. Ils indiquent que la présence d'acide sorbique n'a aucun effet significatif sur la survie des levures soumises à l'irradiation. On a contrôlé en outre dans les essais 1 et 2 que les quantités d'acide sorbique utilisées n'avaient aucun effet fongicide pendant le temps qu'a duré l'expérience.

TABLEAU I

Pourcentage de survie des levures en fonction de la dose d'irradiation, de la teneur en acide sorbique et de la durée d'incubation à pH 3,4

Essai n°	Dose d'acide sorbique (mg/l)	Durée d'incubation (h)	Dose d'irradiation (Krad)						
			0	50	100	150	200	300	400
1	0	1	100	4,8		4,7	2,8		
	100		100	6,4		6,0	3,7		
2	0	1,5	100	9,4	9,0		5,1	3,0	
	300		100	12,0	12,0		9,3	5,1	
3	0	3	100	11,8	10,8		9,1		1,3
	500		100	12,7	9,8		9,5		0,8

La souche de levure utilisée dans ces expériences donne une courbe de survie (fig. 2) présentant un plateau dû à la présence de levures bourgeonnantes, stade qui

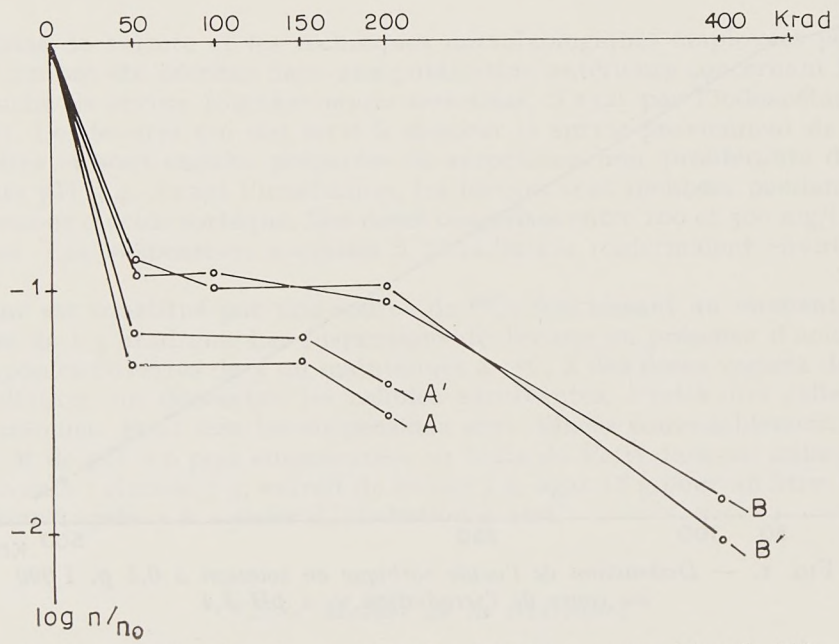


FIG. 2. — *Courbes de survie de* Saccharomyces cerevisiae *S. 132 irradié en tampon Mac Ilvaine pH 3,4*

Essai n° 1. A : sans acide sorbique.
A' : avec 100 mg d'acide sorbique/l et 1 heure d'incubation.
Essai n° 3. B : sans acide sorbique.
B' : avec 500 mg d'acide sorbique/l et 3 heures d'incubation.

est particulièrement résistant aux radiations ionisantes. Ce plateau est situé à des niveaux différents suivant les expériences, car le pourcentage de cellules avec bourgeons varie d'une récolte à l'autre.

C. — *Influence de l'ergostérol sur l'action de l'acide sorbique*

Les courbes de croissance des levures en présence d'acide sorbique et d'ergostérol sont représentées dans la figure 3. La dose de 100 mg/l d'acide sorbique, ayant une action fongistatique nette, a été retenue pour les essais avec l'ergostérol à des concentrations de 0 à 40 mg/l. La population de la culture au départ est de 10^4 cellules/ml. La teneur en ergostérol est limitée dans cette expérience par son insolubilité. Pour assurer une dispersion satisfaisante il est d'ailleurs nécessaire de l'ajouter sous forme de solution alcoolique.

La comparaison des courbes de croissance nous montre que l'ergostérol est sans effet sur l'action fongistatique de l'acide sorbique.

D'autre part, nous n'avons pas remarqué de différence dans l'action de l'acide sorbique sur des levures placées en aérobiose ou en anaérobiose.

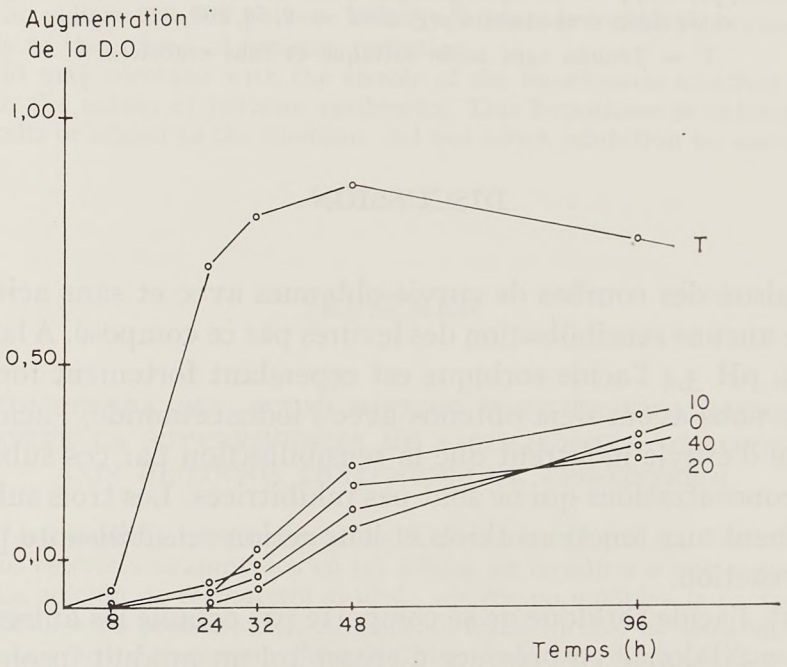


FIG. 3. — *Courbes de croissance de* Saccharomyces cerevisiae *S. 132 en présence d'une même dose d'acide sorbique* (100 mg/) *et de doses croissantes d'ergostérol: 0, 10, 20, 40* mg/l

T = Témoin sans acide sorbique et sans ergostérol

Les résultats du dosage des acides aminés excrétés par les cellules sont représentés dans la figure 4. Ils sont exprimés en µg d'N/mg levure (poids sec). La concentration des levures dans le tampon d'excrétion est de 21,5 mg/ml. Pour une même dose d'acide sorbique (200 mg/l), les concentrations en ergostérol vont de 0 à 200 mg/l. On n'a pas noté de différences importantes dans l'excrétion des acides aminés en faisant varier les doses d'acide sorbique de 0 à 500 mg/l. La comparaison des courbes de la figure 4 nous montre que cette excrétion n'est pas modifiée par la présence d'ergostérol.

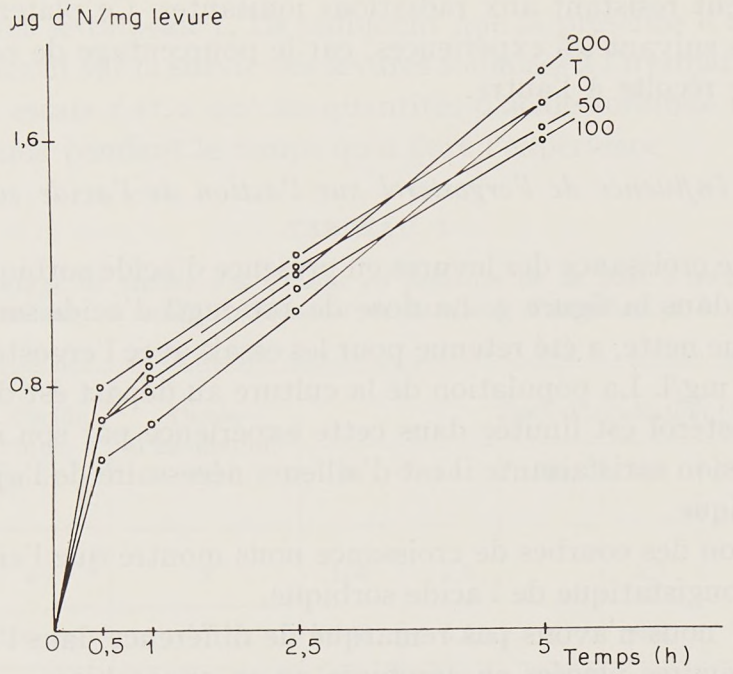


FIG. 4. — *Excrétion des acides aminés par* Saccharomyces cerevisiae *S. 132 en culture anaérobie, pH 3,4, t° = 28°C, en présence d'une même dose d'acide sorbique* (200 mg/l) *et de doses croissantes d'ergostérol = 0, 50, 100, 200 mg/l*

T = Témoin sans acide sorbique et sans ergostérol

DISCUSSION

La comparaison des courbes de survie obtenues avec et sans acide sorbique ne laisse apparaître aucune sensibilisation des levures par ce composé. A la concentration de 500 mg/l et à pH 3,4 l'acide sorbique est cependant fortement fongistatique. Or les résultats que nous avons déjà obtenus avec l'iodoacétamide, l'acide sulfureux et le pyrocarbonate d'éthyle montrent que la sensibilisation par ces substances se produit déjà à des concentrations qui ne sont pas inhibitrices. Les trois substances précédentes se combinent aux fonctions thiols et leur action sensibilisante peut être expliquée par cette réaction.

D'autre part, l'acide sorbique ne se comporte pas comme les autres antibiotiques à polyène. Bien qu'il donne en présence d'ergostérol un produit insoluble, l'addition de stérols ne protège pas les levures. En effet, nous avons observé que ni la dose d'acide sorbique inhibant la croissance, ni la vitesse de croissance, ni l'exsorption des acides aminés ne sont modifiées par l'addition d'ergostérol.

CONCLUSION

L'acide sorbique n'est pas un sensibilisateur des levures à l'action des radiations ionisantes. On ne peut donc penser obtenir une amélioration sensible à la conservation des aliments en combinant l'addition d'acide sorbique à l'irradiation. Dans ce cas particulier, ce composé ne se comporte pas comme ceux qui sont connus pour réagir

avec les fonctions thiols. Les stérols n'interfèrent pas avec l'action de l'acide sorbique sur les levures ce qui le différencie des antibiotiques à polyène. Le mode d'action de l'acide sorbique n'apparaît donc pas clairement et mérite d'être précisé.

Reçu pour publication en novembre 1969.

SUMMARY

COMBINED EFFECTS OF SORBIC ACID AND GAMMA-RAYS ON THE SURVIVAL OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CONTAINING DIFFERENT AMOUNTS OF ERGOSTEROL

Sorbic acid inhibits the growth of *S. cerevisiae* at pH 3.4. The inhibition was not modified by sterols which had accumulated in the yeast cells or which had been added to the growth medium. The addition of ergosterol to the sorbic acid did not modify the release of amino acids from resting cells. Furthermore sorbic acid did not sensitize resting cells to gamma irradiation. In this respect it differs from certain other food additives, such as SO_2 and diethylpyrocarbonate, which are sensitizers. The mode of action of sorbic acid in inhibiting growth is discussed with regard to the following two hypotheses.

1. Sorbic acid may be an-SH poison. This hypothesis is unlikely because sorbic acid does not sensitize cells to the action of ionizing radiation.

2. Sorbic acid may combine with the sterols of the membranes to affect permeability in a manner similar to the action of polyene antibiotics. This hypothesis is unlikely because sterols, accumulated in cells or added to the medium, did not affect inhibition by sorbic acid.

RESUMEN

ACCION COMBINADA DEL ACIDO SORBICO Y DE LA IRRADIACION GAMMA SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CON DISTINTOS CONTENIDOS DE ERGOESTEROL

El ácido sórbico onhibe el crecimiento de *S. cerevisiae* de pH 3,4. La inhibición no queda modificada por los esteroles acumulados en las células de levadura o que son añadidas al medio de crecimiento. La adición de esgoesterol al ácido sórbico no modifica la excreción de los ácidos aminados de las células no proliferantes. Además, el ácido sórbico no sensibiliza a las levaduras no proliferantes a la irradiación gamma. Para ello, el ácido sórbico difiere de diversos otros aditivos alimenticios, como por ejemplo el SO_2 y el dietilpirocarbonato, que son elementos sensibilizadores. La forma de acción del ácido sórbico sobre la inhibición del crecimiento es discutida frente a las dos hipótesis que figuran a continuación :

1. El ácido sórbico puede llegar a ser un veneno de los-SH. Este hipótesis es poco probable debido al hecho de que el ácido sórbico no sensibiliza las células a la acción de las radiaciones ionizantes.

2. El ácido sórbico puede combinarse con los esteroles de la membrana de forma análoga a la acción de los antibióticos de polieno. Esta hipótesis es poco probable debido a que los esteroles, acumulados en las células o añadidos al medio, no afectan en modo alguno la inhibisión por el ácido sórbico.

RIASSUNTO

AZIONE COMBINATA DELL'ACIDO SORBICO E DELL'IRRADIAZIONE GAMMA SULLA SOPRAVVIVENZA DI *SACCAROMICETI CEREVISIAE* AVENTI TENORI DIVERSI IN ERGOSTEROLO

L'acido sorbico inibisce la crescita di *S. cerevisiae* a pH 3,4. L'inibizione non è modificata dagli steroli accumulati nelle cellule di lievito o che vengono aggiunte nel mezzo di crescita. L'aggiunta di ergosterolo all'acido sorbico non modifica l'escrezione degli amminoacidi delle cellule non proliferanti. Inoltre, l'acido sorbico non sensibilizza i lieviti non proliferanti all'irradiazione gamma. Per questo, esso differisce da alcuni altri additivi alimentari, come l'SO_2 e il dietilpirocarbonato che sono dei sensibilizzatori. Il modo d'azione dell'acido sorbico sull'inibizione della crescita è discusso sulla base delle due ipotesi seguenti :

1. L'acido sorbico puo' essere un veleno dei-SH. Questa ipotesi è poco probabile perchè l'acido sorbico non sensibilizza le cellule all'azione delle radiazioni ionizzanti.

2. L'acido sorbico puo' combinarsi agli steroli della membrana in modo analogo all'azione degli antibiotici a poliene. Questa ipotesi è poco probabile perchè gli steroli, accumulati nelle cellule o aggiunte al mezzo, non intervengono nell'inibizione causata dell'acido sorbico.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DUPUY P., TRÉMEAU O., 1964. L'acide sulfureux sensibilisateur des levures aux radiations ionisantes. *Microbial Inhibitors in Food*, 117-129. Almquist et Wiksell, Göteborg.

DUPUY P., TRÉMEAU O., 1966. Radiosensibilisation des levures par l'iodoacétamide. *Internation. J. appl. Radiat. Isotopes*, **17**, 521-529.

DUPUY P., TRÉMEAU O., 1967. Radiosensibilisation des levures par le diéthylpyrocarbonate. *Internation. J. appl. Radiat. Isotopes*, **18**, 253-259.

LAMPEN J. O., MORGAN E. R., SLOCUM A. C., 1957. Effect of nystatin on the utilization of substrates by yeasts and other fungi. *J. Bacteriol.*, **74**, 297-302.

LAMPEN J. O., MORGAN E. R., SLOCUM A. C., ARNOW P., 1959. Absorption of nystatin by microorganisms. *J. Bacteriol.*, **79**, 282-289.

LAMPEN J. O., ARNOW P. M., SAFFERMAN R. S., 1960. Mechanism of protection by sterols against polyene antibiotics. *J. Bacteriol.*, **80**, 200-206.

MOORE S., STEIN W. H., 1954. A modified ninhydrin reagent for photometric determination of amino acids and related compounds. *J. biol. Chem.*, **211**, 907-913.

MORFAUX J. N., DUPUY P., 1966. Comparaison de l'exsorption des acides aminés par une souche de *Saccharomyces cerevisiae* et un mutant résistant à la canavanine. *C. R. Acad. Sci.*, **263**, 1224-1226.

WHITAKER J. R., 1959. Inhibition of sulfhydryl enzymes with sorbic acid. *Food Res.*, **24**, 37-44.

ZYGMUNT W. A., TAVORMINA P. A., 1966. Sterols interferences with antifungal activity of polyene antibiotics. *Appl. Microbiol.*, **14**, 865-869.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (4), 359-366.

NOTE DE LABORATOIRE

DOSAGE ENZYMATIQUE DE L'ACIDE L (—) MALIQUE

C. POUX

avec la collaboration technique de Modeste CAILLET

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Cette étude passe en revue les différentes techniques de dosage enzymatique de l'acide L (—) malique décrites par différents auteurs durant ces dernières années.

Une technique est proposée et l'influence de composés interférants mieux précisée ; en particulier, est mise en évidence l'action de la L-malate déshydrogénase sur l'acide tartrique gauche. La spécificité de cet enzyme n'est donc pas absolue.

I. — INTRODUCTION

Les méthodes de dosage enzymatique sont entrées dans le domaine des applications analytiques depuis que des préparations d'enzymes peuvent être trouvées dans le commerce comme les autres produits de laboratoire. Elles ont l'avantage de leur spécificité, en relation avec la pureté de la préparation enzymatique utilisée, et dans le cas de l'acide L (—) malique qui nous occupe, une durée d'exécution de la manipulation plus réduite et une possibilité de dosages en série.

II. — HISTORIQUE

1. *Méthodes de dosage*

HOHORST (1963) a donné une technique pour le dosage de l'acide L (—) malique dans le sang :

$$\text{L (—) malate}^{+} + \text{NAD} + \text{hydrazine} \xrightarrow[\text{pH 9,5}]{\text{MDH}} \text{oxaloacétate hydrazone} + \text{NADH} + \text{H}_3\text{O}^{+}.$$

La formation du NADH est suivie au spectrophotomètre à 340 nm.

Le mode opératoire est le suivant :

— dans deux cuves de 1 cm d'épaisseur, on introduit :

Cuve témoin	Cuve expérimentale
—	—
H_2O	0,9 ml tampon hydrazine glycine (1)
	0,1 ml NAD (2)
	1,0 ml extrait déprotéinisé.

Au bout de 3 minutes, on lit E_1, densité optique obtenue à 334, 340 ou 366 nm ; on ajoute aussitôt 0,02 ml de MDH (3) dans la cuve expérimentale, et, au bout de 20 minutes, on note E_2 densité optique lue à la même longueur d'onde que E_1.

Le L (—) malate réagit quantitativement et la teneur de l'échantillon est calculée selon la formule :

$$\frac{\Delta E \times \text{dil.}}{\Sigma \times d} = \mu \text{ moles L(—) malate/g}$$

$\Delta E = E_2 - E_1$

dil. = dilution totale de l'essai

Σ = coefficient d'extinction moléculaire du NADH

d = épaisseur de la cuve en centimètres.

Nordmann, Arnaud et Nordmann (1963), utilisent cette méthode de dosage de l'acide L (—) malique dans le sang ; pour réduire les variations de densité optique dues au tampon, ils diminuent la concentration en sulfate d'hydrazine (tampon glycine, sulfate d'hydrazine, NaOH (1 M — 0,1 M — 0,274 M. pH = 9,6)).

Mayer et Ingrid Busch (1963) ont appliqué cette technique au raisin et au vin en modifiant légèrement le mode opératoire : suppression de la déprotéinisation des échantillons et maintien de la température constante à 25° ou 37°.

Blouin et Peynaud (1965) comparent quelques méthodes de dosage de l'acide L (—) malique du vin et présentent la méthode enzymatique de Mayer et Busch avec quelques modifications. Ils opèrent à température ambiante et augmentent le volume de tampon dans l'essai : 2 ml au lieu de 0,9.

2. *Causes d'erreur ou interférences*

Hohorst (1963) signale des causes d'erreur pouvant provenir des réactifs, comme la conservation prolongée de l'enzyme ou du tampon, le pH ou la température ambiante trop élevée. Nordmann, Arnaud et Nordmann (1963) indiquent que les acides lactiques et β-hydroxybutyrique n'interfèrent pas dans le dosage, de même que l'acide D-malique. Mayer et Busch (1963) notent que dans les conditions du dosage la réaction est complète à 37°, que la durée de 20 mn est satisfaisante et que la réaction est quantitative lorsque la solution contient de 3 à 40 µg d'acide L (—) malique dans la prise d'essai. Ils étudient l'influence que pourraient avoir certains composés apportés, même à teneurs élevées, avec le substrat comme : SO_2 (100 mg/l), glucose (100 g/l), éthanol (120 ml/l), acides citrique, succinique, ascorbique, acétique (2 g/l), le ferrocyanure de potassium (10 mg/l), et l'actidione (2 mg/l). Aucun de ces composés n'interfère dans le dosage. La stéréospécificité de la MDH est vérifiée ; seule réagit la moitié de l'acide malique racémique introduit.

(1) Tampon hydrazine-glycine, pH 9,5 (0,4 M hydrazine, 1 M glycine) 7,5 g glycine + 5,2 sulfate d'hydrazine + 0,2 g EDTA, Na_2H_2 2 H_2O dans H_2O distillée + 51 ml NaOH 2 N + H_2O q.s.p. → 100 ml.

(2) Nicotinamide adénine nucléotide (NAD) (5 × 10^{-2} M NAD) 40 mg/ml.

(3) Malicodéshydrogénase (MDH) (5 mg protéines/ml) dilution au 1/2 de la solution MDH à 10 mg de protéines par ml avec une solution de $SO_4(NH_4)_2$ 2,8 M.

III. — MÉTHODE DE DOSAGE PROPOSÉE

Nous avons utilisé cette méthode enzymatique pour étudier l'évolution de l'acide L (—) malique au cours de différents travaux (maturation, fermentation malolactique, vinification continue) où nous l'avons appliquée à des dosages en série avec certaines modifications aux méthodes déjà décrites.

Pour cela on opère :

— avec des pipettes automatiques et on laisse se développer la réaction dans des tubes à hémolyse au lieu de cuves spectrophotométriques, en raison de l'oxydation dans le temps des polyphénols en milieu alcalin. On utilise ici comme témoin le même milieu sans enzyme.

— La solution de NAD (2) de HOHORST à 40 mg/ml est diluée à 10 mg/ml et le volume pour chaque essai porté à 0,4 ml, ceci afin de diminuer entre les essais et le témoin les erreurs relatives dues à la faiblesse du volume mis en œuvre. L'élévation de densité optique apportée par les 4 mg de ce composé dans chaque essai est de l'ordre de 0,240 unités de D. O.

— le tampon utilisé est celui de HOHORST (1). Comme PEYNAUD et BLOUIN, on répartit 2 ml au lieu de 0,9 ml par essai ; dans ces conditions le palier, obtenu plus rapidement, est bien plus stable (fig. 1).

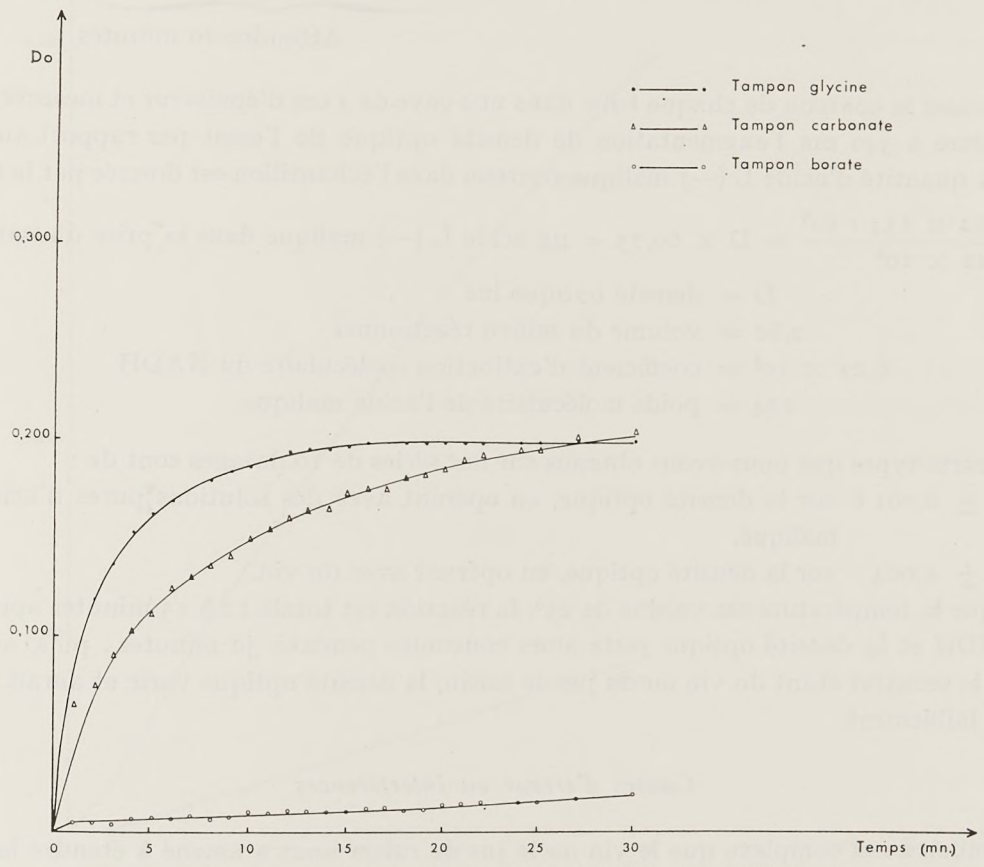


FIG. 1. — *Développement de la réaction enzymatique*

	Témoin	Essai
Tampon	0	2 ml (10,5 gμ)
Acide L (—) malique	0	0,4 ml (10,5 gμ)
NAD	0	0,4 ml
H_2O	2,82	—
MDH	0	0,02 ml

Le dosage pourrait s'effectuer avec un tampon carbonate pH 9,50 ou un tampon *Tris* pH 9,00 (Colowick et Kaplan, 1955), supplémenté en sulfate d'hydrazine neutralisé par NaOH 2 N, aux mêmes concentrations que le tampon glycine de Hohorst ; mais on n'obtient pas avec ces tampons (dont la prise d'essai est de 2 ml) un palier aussi régulier qu'avec le tampon glycine.

Le tampon borate, pH 9,5 (Colowick et Kaplan, 1955) également supplémenté en hydrazine a une action inhibitrice très nette (fig. 1) ; il ne peut être utilisé.

A la température du laboratoire, voisine de 20°, la réaction est linéaire entre 0 et 40 µg d'acide L (—) malique dans la prise d'essai ; il est donc nécessaire de diluer de façon adéquate les échantillons à doser.

Mode opératoire proposé :

Dans 2 tubes à hémolyse, répartir :

	Tube témoin	Tube expérimental
Tampon [1]	2 ml	2 ml
Vin ou jus de raisin (dilué, si nécessaire)	0,4 ml	0,4 ml
NAD (solution à 10 mg par ml)	0,4 ml	0,4 ml
	Attendre 3 minutes	
MDH [3]		0,02 ml
	Attendre 20 minutes	

Transvaser le contenu de chaque tube dans une cuve de 1 cm d'épaisseur et mesurer au spectrophotomètre à 340 nm l'augmentation de densité optique de l'essai par rapport au témoin, soit D. La quantité d'acide L (—) malique contenu dans l'échantillon est donnée par la formule :

$$\frac{D \times 2{,}82 \times 134 \cdot 10^6}{6{,}22 \times 10^6} = D \times 60{,}75 = \mu g \text{ acide L (—) malique dans la prise d'essai}$$

D = densité optique lue
2,82 = volume du milieu réactionnel
$6{,}22 \times 10^6$ = coefficient d'extinction moléculaire du NADH
134 = poids moléculaire de l'acide malique.

Les écarts-types que nous avons obtenus sur des séries de 10 dosages sont de :
$\sigma = \pm$ 0,001 6 sur la densité optique, en opérant avec des solutions pures d'acide L (—) malique.
$\sigma = \pm$ 0,004 sur la densité optique, en opérant avec du vin.

Lorsque la température est voisine de 25°, la réaction est totale 12 à 15 minutes après l'addition de MDH et la densité optique reste alors constante pendant 30 minutes ; puis, au-delà de ce temps, le substrat étant du vin ou du jus de raisin, la densité optique varie et aurait tendance à s'élever faiblement.

Causes d'erreur ou interférences

Un milieu aussi complexe que le vin ou le jus de raisin nous a amené à étendre la liste des corps susceptibles d'interférer dans le dosage. C'est ainsi que nous avons étudié l'action du fructose, de l'arabinose, des acides tartrique, lactique, isocitrique, DL-citramalique et du SO_2 dans le cas des mutés.

Les résultats obtenus font l'objet du tableau 1.

Le tartrate gauche d'ammonium interfère nettement et, d'après Davies et Kun (1957), la MDH catalyse la réaction :

TABLEAU I

Corps étudiés (teneurs par litre)	Acide L (–) malique trouvé par litre (g)	Pourcentage retrouvé (%)
12,4 g acide L (–) malique		
+ 0,30 g fructose	12,4	100
+ 3 g fructose	12,6	101,7
+ 0,1 g arabinose.....	12,4	100
+ 1,0 g arabinose.....	12,4	100
0,70 g acide L (–) malique		
+ 2,0 méq. acide L (–) tartrique	0,70	100
+ 30,0 méq. acide L (–) tartrique	0,70	100
+ 30,0 méq. tartrate (L–) NH_4 .	0,96	137
9,4 g acide L (–) malique		
+ 0,259 g acide lactique	9,60	102,1
+ 2,59 g acide lactique	9,80	104,2
0,4 g acide isocitrique	Pas de modification	
150,0 mg DL-citramalique	Aucune interférence	

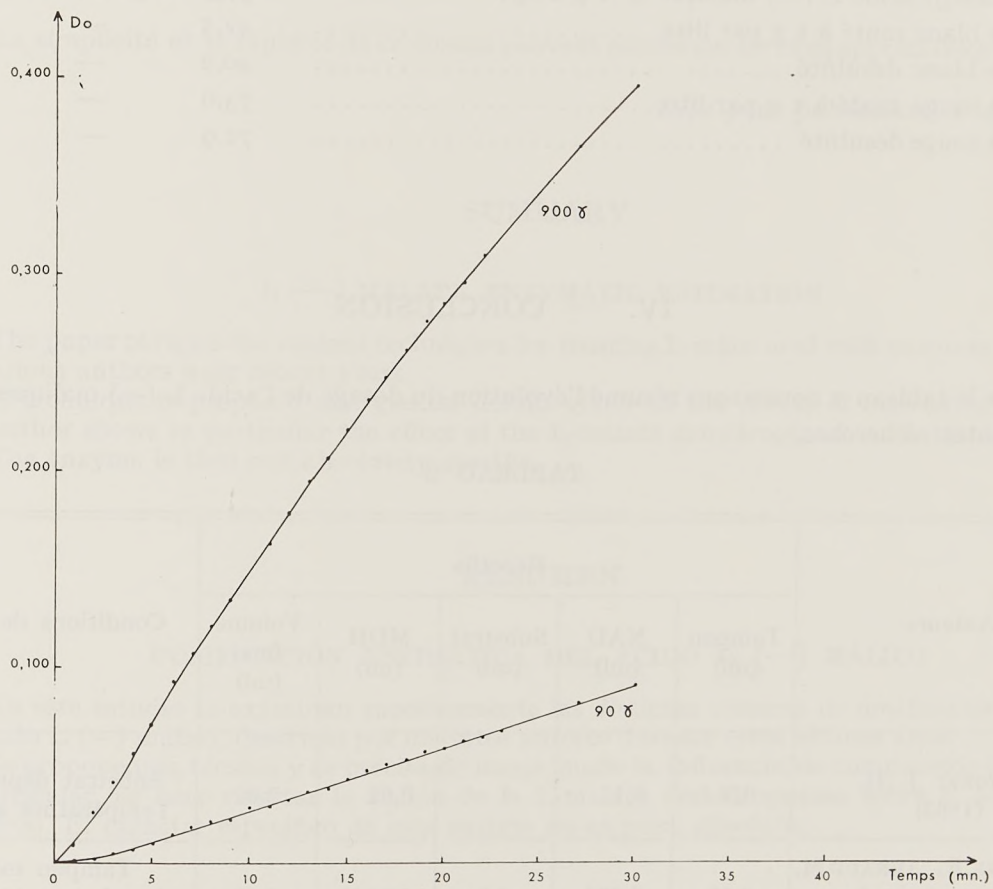


FIG. 2. — *Influence de l'acide tartrique gauche*

	Témoin	Essai 1	Essai 2
Tampon	2	2	2
Acide tartrique gauche	/	0,4 (900 µg)	0,4 (90 µg)
H_2O	0,4	/	/
NAD	0,4	0,4	0,4
MDH	/	0,02	0,02

$$\text{L (—) tartrate} + \text{NAD} \rightarrow \text{oxaloglycolate} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

La figure 2 montre le déroulement continu de la réaction.

L'influence du SO_2 a été étudiée par Pfleiderer, Jackel et Wieland (1956). Ces auteurs notent que 5 µg de SO_2 par ml de milieu réactionnel entraînent une inhibition de 33 p. 100 de l'enzyme. Mayer et Buch utilisent une dose de 100 mg par litre et ne signalent aucune interférence.

Voici les résultats obtenus pour une prise d'essai de 0,4 ml contenant 28,3 µg d'acide L (—) malique, en présence de quantités croissantes de cet antiseptique :

28,3 µg acide L (—) malique		trouvé : 28,3 µg soit 100	p. 100
—	+ 18,75 µg SO_2	trouvé : 28,3 µg soit 100	p. 100
—	+ 37,50 µg SO_2	trouvé : 28,3 µg soit 100	p. 100
—	+ 75,00 µg SO_2	trouvé : 28 µg soit 98,9	p. 100
—	+ 112,50 µg SO_2	trouvé : 27,4 µg soit 96,8	p. 100
—	+ 150,00 µg SO_2	trouvé : 27,2 µg soit 94,7	p. 100

Des doses très élevées de SO_2 inhibent légèrement la réaction. Dans la pratique il est très rare que se présentent de telles concentrations. Les jus de raisin mutés, dont la concentration en SO_2 total est de 1 g par litre, nécessitent une dilution au 1/100; la quantité de SO_2 dans la prise d'essai n'est plus alors que de 4 µg. Voici d'ailleurs les résultats obtenus avec des jus mutés et désulfités :

38 méq/l acide L (—) malique + 1 g SO_2/l	37,5 méq/l retrouvés
Jus blanc muté à 1 g par litre	42,5 —
Jus blanc désulfité	40,2 —
Jus rouge muté à 1 g par litre	73,6 —
Jus rouge désulfité	72,9 —

IV. — CONCLUSION

Dans le tableau 2 nous avons résumé l'évolution du dosage de l'acide L (—) malique au cours de différentes recherches.

TABLEAU 2

Auteurs	Réactifs					Conditions de dosage
	Tampon (ml)	NAD (ml)	Substrat (ml)	MDH (ml)	Volume final (ml)	
Hohorst J. H. (1962)	0,9	0,1	1	0,02	2,02	Substrat déprotéinisé Température ambiante
Nordmann R., Arnaud M. et Nordmann J. (1963)	0,45	0,05*	2,5	0,02**	3,02	Tampon modifié + substrat 15 minutes et avant addition de MDH

TABLEAU 2 (*suite*)

Auteurs	Réactifs					Conditions de dosage
	Tampon (ml)	NAD (ml)	Substrat (ml)	MDH (ml)	Volume final	
MAYER K. et BUSCH I. (1963)	0,9 + 1 H_2O	0,1	1	0,02	3,02	Incubation au B.M. Température 25° ou 37° Substrat non déprotéinisé
BLOUIN J. et PEYNAUD E. (1965)	2	0,1	0,5	0,02	2,62	Température ambiante Vin non déprotéinisé
Technique proposée (1967)	2	0,4	0,4	0,02	2,82	Température ambiante (20°-25°) Vin ou jus dilué

* = NAD (6×10^{-2} M).
** = MDH : solution à 5 mg de protéines/ml dans du glycérol à 30 p. 100.

La simplicité et la rapidité de ce dosage peuvent rendre des services appréciables en Œnologie.

Reçu pour publication en août 1969.

SUMMARY

L (—) MALATE ENZYMATIC ESTIMATION

The paper reviews the various techniques for treating L-malic acid with enzymes as described by various authors over recent years.

A technique is proposed and greater details given on the effects of interfering compounds. The author shows in particular the effect of the L-malate dehydrogenase on L-tartaric acid.

The enzyme is thus not absolutely specific.

RESUMEN

DOSIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ACIDO L (—) MÁLICO

En este estudio se examinan sucesivamente las distintas técnicas de dosificación enzimática del ácido L (—) málico, descritas por distintos autores durante estos últimos años.

Se propone una técnica y se precisa de mejor modo la influencia de compuestos interferentes en particular, se hace resaltar la acción de la L-malata deshidrogenasa sobre el ácido tártrico izquierdo. El carácter específico de esta enzima no es pues, absoluto.

RIASSUNTO

DOSAGGIO ENZIMATICO DELL'ACIDO L (—) MALICO

Questo studio passa in rivista le differenti tecniche di dosatura enzimatica dell'acido L (—) malico descritte da diversi autori durante questi ultimi anni.

Una tecnica è proposta e l'influenza di composti interferenti meglio precisata : in particolare. è messa in evidenza l'azione della L-malata desidrogenasi sull'acido tartrico sinistro.

La specificita di questo enzima non è dunque assoluta.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Colowick S. P., Kaplan, 1955. *Methods in enzymology.* Academic Press, New York, **1**, 144-146.

Davies D. D., Kun E., 1967. *Biochem. J.*, **66**, 307 ; d'après Kun E., 1963. *The enzymes.* Academic Press, New York and London, **7**, 151.

Hohorst H. J., 1963. L (—) malate. Determination with malic deshydrogenase and DPN- in : *Methods of enzymatic analysis.* Academic Press, New York, 328-332.

Mayer K., Busch I., 1963. Über eine enzymatische Apfelsäurebestimmung in Wein und Traubensaft. *Trav. Chim. aliment. Hyg.* (Berne), **54** (1), 60-65.

Nordmann R., Arnaud M., Nordmann J., 1963. Dosage enzymatique de l'acide L (—) malique sanguin. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **45** (7-8), 803.

Peynaud E., Blouin J., 1965. Comparaison de quelques méthodes de dosage de l'acide L (—) malique. *Ann. Technol. agric.*, **14** (1), 61-66.

Pfleiderer G., Jackel D., Wieland T., 1956. *Biochem. Z.*, **328**, 187 ; d'après Kun E., 1963. *Malate dehydrogenase*, in *The enzymes.* Academic Press, New York and London, **7**, 156.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (4), 367-374.

NOTE DE LABORATOIRE

DÉTERMINATION DU DEGRÉ ALCOOLIQUE DE VINS ET DE SOLUTIONS HYDROALCOOLIQUES A FAIBLES CONCENTRATIONS EN ÉTHANOL AU MOYEN DU MÉLANGE SULFOCHROMIQUE

M. FLANZY, P. BÉNARD, C. FLANZY et A. SCHOBER
avec la collaboration technique de P. PERRY et M. TACCHINI

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, 84 - Montfavet
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

La durée et le prix de revient du dosage de l'éthanol par oxydation chromique (FLANZY *et al.*, 1955) peuvent être diminués par une réduction du volume des réactifs ; cette modification n'entraîne pas de variations dans la précision de la méthode.

En outre, les résultats acquis par cette technique, pour des teneurs en alcool éthylique de l'ordre du dixième de degré, concordent avec ceux obtenus par pycnométrie.

INTRODUCTION

L'une des méthodes de référence choisie pour mesurer la teneur de l'éthanol dans les boissons, repose sur le principe de l'oxydation de l'alcool en acide acétique au moyen du mélange sulfochromique (méthode dite par «oxydation chromique»). Dans des notes précédentes (SÉMICHON, FLANZY, 1929 et FLANZY *et al.*, 1955), la précision de ce dosage pour des quantités d'éthanol habituellement rencontrées dans les vins (de l'ordre de 10°), a été établie ; notamment, les conditions optimales de dilution et de concentration en acide orthophosphorique pour que la réaction colorée du diphénylaminosulfonate de baryum ait le maximum de sensibilité, ont été indiquées.

Une variante de la méthode de dosage de l'excès de bichromate a été proposée par l'un d'entre nous (FLANZY, 1935). Elle est basée sur le dosage par « ioduration-oxydation » ; elle donne une bonne précision pour des quantités réduites d'alcool.

Il nous a semblé intéressant d'apprécier la sensibilité, la fidélité et la justesse de la méthode par oxydation chromique pour des solutions hydroalcooliques à très faible teneur en alcool (5 p. 100 à 1 p. 100) ; d'autre part, dans le double but d'augmenter la rapidité du dosage et d'abaisser son prix de revient, il nous a paru souhaitable de voir si une diminution des volumes respectifs d'acide orthophosphorique et d'eau distillée restait compatible avec une bonne qualité des mesures.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Quatre séries d'essais sont réalisées. Les deux premières permettent de comparer la méthode par oxydation chromique dans ses versions 1955 et 1968. Les deux dernières séries testent la méthode modifiée « 1968 » pour de faibles concentrations en éthanol.

Série n° 1

Dix dosages successifs du distillat d'une solution hydroalcoolique d'environ 5° d'alcool (titre réfractométrique : 5°07), sont effectués par chacune des deux méthodes chimiques 1955 et 1968. Cinquante millilitres sont distillés ; le distillat est amené à 250 ml ; la prise d'essai pour chaque dosage est de 10 ml.

La méthode 1955 demande 35 ml d'acide orthophosphorique et 325 ml d'eau distillée, alors que la méthode 1968 utilise 5 ml d'acide orthophosphorique et 25 ml d'eau distillée.

Série n° 2

Les distillats de dix échantillons de vins rouges sont analysés par la méthode chimique 1955 et sa variante 1968. A titre comparatif, les distillats sont aussi titrés par aréométrie, réfractométrie et selon la méthode utilisée par le Service de la Répression des Fraudes ; celle-ci est marquée par un dosage en retour avec emploi supplémentaire de MnO_4K.

Série n° 3

Les solutions de 5° à 10°, obtenues par dilution aqueuse d'éthanol RP, sont distillées. Les distillats sont dosés par pycnométrie et par la méthode « oxydation chromique » 1968. La préparation du distillat et le dosage par oxydation chromique sont réalisés dans les conditions définies pour la série 1. L'échantillon pycnométrique est obtenu en distillant 200 ml de solution (200 ml prise essai + 20 ml eau de lavage) et en recueillant 200 ml.

Série n° 4

Une surcharge d'éthanol est ajoutée à une solution aqueuse de vin précédemment analysée ; la nouvelle solution est, à son tour, analysée pour voir la correspondance entre la teneur théorique et la teneur expérimentale d'alcool. Le protocole expérimental suivant est adopté :

trois solutions R, A et B sont réalisées (tous les composants des solutions sont amenés à 15°C et les manipulations sont effectuées à cette température).

Solution R : 7,937 g d'éthanol RP purifié (passage sur Na et redistillation en présence de $CaCl_2$) sont pesés à la balance de précision ($\pm$ 0,1 mg) et placés dans un ballon jaugé de 1 000 ml. L'alcool représente un volume d'environ 10 ml. Le remplissage du ballon jusqu'au trait de jauge est réalisé par de l'eau bidistillée.

Solution A : 50 ml d'un vin rouge de 11° sont versés dans un ballon jaugé de 1 000 ml et dilués jusqu'au trait de jauge par de l'eau bidistillée.

Solution B : 7,937 g d'éthanol RP purifié sont placés dans un ballon jaugé de 1 000 ml. Le remplissage du ballon est complété par un certain volume de solution A ; ce volume est d'environ 990 ml, compte tenu de la contraction due à l'alcool.

Cinquante millilitres des trois solutions sont successivement distillées dans l'appareil JAULMES ; les distillats sont amenés à 250 ml. Des prises de 10 ml de ces distillats servent à la détermination chimique (méthode 1968) de la teneur en éthanol des solutions R, A, B. Le dosage pycnométrique est réalisé sur les distillats (obtenus à partir de 200 ml de solution) des échantillons R et B.

RÉSULTATS — DISCUSSION

Série n° 1

Les résultats analytiques et leur interprétation statistique (selon LACROIX) sont rapportés dans le tableau 1.

TABLEAU I

Comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes chimiques 1955 et 1968 au cours de la détermination de la teneur en éthanol d'une solution hydroalcoolique

Conditions expérimentales :

Cinquante millilitres d'une solution hydroalcoolique d'environ 5° d'alcool sont distillés ; le distillat est amené à 250 ml ; la prise d'essai pour chaque dosage est de 10 ml.

Dix dosages sont effectués pour chacune des deux méthodes.

Les conditions de dosage sont celles décrites dans la note de 1955, seuls varient les volumes de réactifs.

Expression des résultats :

Les résultats sont directement exprimés en degrés volumétriques.

Les calculs statistiques sont conduits d'après la méthode de LACROIX.

Méthode oxydation chromique	1955	1968
Volumes des réactifs	35 ml H_3PO_4 325 ml H_2O	5 ml H_3PO_4 25 ml H_2O
Résultats	4°979 4°979 4°979 4°979 4°955 5°003 4°979 4°967 4°967 4°979	4°979 4°955 5°003 5°003 5°003 5°003 5°009 4°979 4°982 4°987
Calculs		
$\bar{x}$	4°978	4°990
σ	$11{,}942 \cdot 10^{-3}$	$16{,}920 \cdot 10^{-3}$
Limites des mesures pour P = 0,95	4°951-5°005	4°952-5°003
Précision des mesures p. 100	0,54	0,77
σ_m	$3{,}77 \cdot 10^{-3}$	$5{,}35 \cdot 10^{-3}$
Limites valeur moyenne pour P = 0,95	4°969-4°986	4°978-5°002
Précision valeur moyenne p. 100	0,17	0,24

La comparaison des deux séries de résultats donne un t expérimental de 0,603 et le t des tables de Fisher est de 2,101. La différence n'étant pas significative, nous considérons que les deux méthodes conduisent à des résultats identiques.

Série n° 2

Le tableau 2 donne les résultats obtenus pour les distillats des 10 vins.

TABLEAU 2

Comparaison des degrés alcooliques obtenus selon cinq méthodes de dosage pour dix vins rouges

Les conditions expérimentales sont celles suivies pour des analyses de pratique courante

Méthodes	Alcoométrie	Réfractométrie	1955 35 ml H_3PO_4 325 ml H_2O	1968 5 ml H_3PO_4 25 ml H_3O	Répression des fraudes
N° échantillon					
1	12°45	12°37	12°45	12°40	12°42
2	11°40	11°36	11°42	11°38	11°40
3	10°90	10°88	10°93	10°91	10°94
4	9°95	9°96	9°92	9°95	9°93
5	9°80	9°83	9°83	9°82	9°80
6	12°85	12°86	12°86	12°87	12°88
7	10°30	10°27	10°29	10°29	10°27
8	12°30	12°25	12°30	12°27	12°30
9	11°35	11°30	11°37	11°31	11°34
10	10°75	10°71	10°69	10°76	10°73

En prenant comme référence la méthode utilisée par le Service de la Répression des Fraudes, nous constatons que les deux méthodes 1955 et 1968, donnent, dans tous les cas, des résultats acceptables pour des dosages de pratique courante :

écart moyen entre les deux méthodes « oxydation chromique » : 3 centièmes de degré ;

écart moyen entre chacune des deux méthodes « oxydation chromique » et la méthode « Répression des Fraudes » : environ 2 centièmes de degré.

Le temps nécessaire au dosage des 10 échantillons (distillation non comprise) est de 1 h 30 pour la méthode 1968, 2 h 05 pour la méthode 1955, 1 h 40 pour celle utilisée par le Service de la Répression des Fraudes.

Il convient de noter qu'un gain de temps appréciable peut être obtenu par l'emploi de systèmes simples de pipettage semi-automatique.

Série n° 3

Le tableau 3 montre que les différences entre les valeurs obtenues par pycnométrie et celles acquises par « oxydation chromique 1968 » passent de 10^{-3} à $4 \cdot 10^{-2}$ degré alcoolique pour des teneurs respectives en éthanol de l'ordre de 10^{-1} et 5 degrés ; ceci correspond à environ 1 p. 100 d'écart entre les deux méthodes.

Compte tenu des dilutions, la méthode 1968 permet de doser au minimum, dans la prise d'essai, 1,6 mg d'éthanol avec une précision (selon LACROIX) de 6 p. 100, soit 1,6 $\pm$ 0,096 mg.

Avec une probabilité de 0,95, la fidélité d'une mesure croît de 6 p. 100 pour 10^{-1} degré alcoolique à 0,26 p. 100 pour 5 degrés.

Série n° 4

La teneur moyenne d'éthanol récupéré dans la solution de référence R est de 1 804 mg par litre ; elle représente à 2 p. 100 près le poids d'alcool initialement mis en solution : 7 937 mg (tabl. 4).

TABLEAU 3

Comparaison des degrés pycnométriques et chimiques de solutions à faibles teneurs en éthanol

Conditions expérimentales :

Cinquante millilitres de solution sont distillés ; le distillat, amené à 250 ml, sert à la détermination chimique de l'alcool. Prise d'essai: 10 ml. Dix dosages sont effectués pour chaque solution. Le distillat servant au dosage pycnométrique est obtenu à partir de 200 ml de solution. Trois dosages sont réalisés par solution.

Expression des résultats :

Les résultats sont exprimés en degrés alcooliques. Les valeurs pycnométriques représentent les moyennes des teneurs trouvées dans les trois dosages.

Dans la deuxième ligne horizontale, les différences entre valeurs moyennes et pycnonométriques sont rapportées.

En admettant que la solution à 10^{-1} degré contienne 793 mg d'éthanol par litre, la quantité d'alcool contenue dans les 10 ml de prise d'essai (oxydation chromique) est de :

$$\frac{793 \times 50 \times 10}{1\,000 \times 250} \simeq 1{,}6 \text{ mg}$$

Pycnomètre	0°10	0°20	0°49	0°96	1°94	4°89
Différence entre degré chimique et degré pycnométrique.....	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	$2 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-2}$
Méthode chimique 1968 (5 ml H_3PO_4, 25 ml H_2O)	0°097 0°097 0°097 0°097 0°102 0°097 0°097 0°103 0°102 0°097	0°198 0°186 0°186 0°173 0°186 0°198 0°186 0°198 0°198 0°198	0°494 0°494 0°494 0°494 0°482 0°482 0°482 0°482 0°494 0°494	0°988 0°988 0°988 0°988 0,976 0°982 0°988 0°976 0°976 0°988	1°969 1°969 1°956 1°956 1°956 1°969 1°956 1°956 1°969 1°956	4°935 4°924 4°924 4°935 4°935 4°935 4°924 4°935 4°935 4°924
Calculs						
$\bar{x}$.....	0,098 6	0,190 7	0,489 2	0,984 4	1,961 2	4,930 6
σ	$0{,}260\,5 \cdot 10^{-2}$	$0{,}861\,5 \cdot 10^{-2}$	$0{,}619\,6 \cdot 10^{-2}$	$0{,}579\,3 \cdot 10^{-2}$	$0{,}671 \cdot 10^{-3}$	$0{,}567 \cdot 10^{-2}$
Limites des mesures pour P = 0,95....	0°093-0°104	0°198-0°193	0°475-0°503	0°971-0°998	1°946 0-1°976 3	4°917 8-4°953 4
Précision des mesures p. 100	5,98	10,22	2,86	1,33	0,77	0,26
σ_m	$8{,}2 \cdot 10^{-4}$	$27{,}2 \cdot 10^{-4}$	$19{,}6 \cdot 10^{-4}$	$17{,}39 \cdot 10^{-4}$	$20{,}15 \cdot 10^{-4}$	$17{,}05 \cdot 10^{-4}$
Limites valeur moyenne pour P = 0,95	0°097-0°100	0°185-0°197	0°485-0°494	0°980-0°988	1°956 6-1°965 8	4°926 8-4°934 4
Précision valeur moyenne p. 100	1,88	3,22	0,90	0,39	0,2	0,08

La solution A contient 4 351 mg d'éthanol par litre. En admettant que les 7 937 mg d'alcool éthylique RP placés dans l'échantillon B correspondent à un volume de 10 ml, les 990 ml de solution A destinés à compléter la solution B correspondent à 4 351 mg d'alcool.

TABLEAU 4

Essai de surcharge en éthanol d'une solution diluée de vin

Conditions expérimentales :

7,937 g d'éthanol RP sont pesés et mis en solution dans une quantité suffisante d'eau distillée pour obtenir 1 litre de solution de référence R.

Un vin est dilué de façon à former une solution A titrant environ 0°5.

7,937 g d'éthanol RP sont pesés et mis en solution dans une quantité suffisante de solution A pour obtenir 1 litre de solution B.

Cinquante millilitres de solution sont distillé. Le distillat est amené à 250 ml ; prise d'essai 10 ml. Dix dosages chimiques « 1968 » sont effectués pour chaque solution.

Un dosage pycnométrique est réalisé pour les solutions R et B.

Expression des résultats :

Pour chaque solution les résultats sont exprimés en millilitres de liqueur de sel de Mohr et en milligrammes d'éthanol par litre. Une 3e colonne dans la rubrique « solution B » donne les carrés des différences avec la moyenne, en vue de l'étude statistique (selon LACROIX) des résultats obtenus pour cette dernière solution. (Les calculs statistiques sont donnés sous le tableau.)

Le volume de sel de Mohr utilisé pour le témoin est de 40,2 ml.

Le titre du bichromate étant de 0,983, la conversion du volume de sel de Mohr x utilisé pour un essai, en mg d'éthanol par litre s'effectue ainsi :

$$7{,}937 \times \frac{40{,}2 - x}{2} \times 0{,}983 \times \frac{250 \times 1\,000}{10 \times 50} = (40{,}2 - x) \times 1951 \text{ mg}$$

Les degrés chimiques et pycnométriques sont donnés dans les deux dernières lignes horizontales du tableau.

Solution R			Solution A		Solution B		
N° dosage	x = ml sel de Mohr	Éthanol (mg/l)	x = ml sel de Mohr	Éthanol (mg/l)	x = ml sel de Mohr	Éthanol (mg/l)	$(x - \bar{x})^2$
1	36,20	7 804	39,00	4 922	33,85	12 389	9 525,76
2	36,30	7 609	38,00	4 292	33,85	12 389	9 525,76
3	36,10	7 999	37,95	4 390	33,95	12 194	9 486,76
4	36,20	7 804	38,00	4 292	33,95	12 194	9 486,76
5	36,20	7 804	38,00	4 292	33,95	12 194	9 486,76
6	36,20	7 804	37,95	4 390	33,80	12 486	37 869,16
7	36,25	7 706	37,95	4 390	33,90	12 291	0,16

Théoriquement, cette dernière solution contient 11 720 mg d'éthanol par litre ; la valeur mesurée est supérieure de 4 p. 100 à cette quantité théorique.

Ces variations ne peuvent s'expliquer entièrement par des erreurs possibles de pesée. Il semble donc que le milieu biologique interfère dans le dosage. Cette interférence conduit à une précision de la méthode différente de celle obtenue avec des solutions synthétiques.

La valeur de cette interférence risque de varier avec la concentration du milieu biologique. Dans 95 p. 100 des cas, la fidélité d'une mesure, pour la solution B, est de 2 p. 100.

TABLEAU 4 *(suite)*

Solution R			Solution A		Solution B		
N° dosage	x = ml sel de Mohr	Éthanol (mg/l)	x = ml sel de Mohr	Éthanol (mg/l)	x = ml sel de Mohr	Éthanol (mg/l)	$(x -)\bar{x}^2$
8	36,20	7 804	37,90	4 387	33,95	12 194	9 486,76
9	36,20	7 804	37,95	4 390	33,85	12 389	9 525,76
10	36,20	7 804	37,95	4 390	33,95	12 194	9 486,76
Σ	362,05	—	379,65	—	339,00	—	113 880
$\bar{x}$	36,20	→ 7 804	37,97	→ 4 351	33,90	→ 12 291,4	
Degré chimique ...	0°,978		0°,541		1°,529		
Degré pycnométrique.....	0°,975				1°,531		

Calculs statistiques relatifs à la solution B :

v = 12 563 σ = 112,5 Limite des mesures pour P = 0,95
12 037 et 12 546
Précision : 2 p. 100

σ_m = 35,6 Limites de la moyenne pour P = 0,95
12 211 et 12 372
Précision : 0,7 p. 100

Une très bonne correspondance existe entre les degrés alcooliques obtenus par pycnométrie et par voie chimique.

CONCLUSION

Le prix de revient et la durée du dosage de l'éthanol par la méthode d'oxydation chromique selon FLANZY, BOUZIGUES et BOUZIGUES (1955), peuvent être sensiblement abaissés.

En effet, une modification des pourcentages respectifs d'acide phosphorique (5 ml au lieu de 35 ml) et d'eau distillée (25 ml au lieu de 325 ml), tout en permettant d'opérer sur des volumes plus commodes en analyses de routine, n'altère pas la précision de la méthode ; la concordance entre les résultats obtenus par voie chimique et par pycnométrie n'est pas diminuée.

Cette méthode ainsi modifiée reste sensible à des quantités d'alcool éthylique de l'ordre du mg. Elle permet le dosage de solutions à très faibles concentrations en éthanol avec une précision satisfaisante.

Reçu pour publication en octobre 1969.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

FLANZY M., 1935. Nouvelle méthode de dosage de faibles quantités d'alcool méthylique en présence d'alcool éthylique et de ses homologues en quantités très importantes. *Ann. Falsif. Fraudes*, **28**, 260-280.

FLANZY M., BOUZIGUES Mme L., BOUZIGUES H., 1955. La détermination chimique du degré alcoolique du vin par le mélange sulfochromique. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 397-415.

JAULMES P., TEP Y., BRUN Mme S., 1968. Le dosage de l'alcool par oxydation sulfochromique. Extrait des *Travaux de la Soc. Pharm. Montpellier*, **28**, 263-273.

LACROIX Y., 1962. *Analyse chimique. Interprétation des résultats par le calcul statistique.* Masson éditeur, Paris.

LAURENT J., 1968. Grandeurs et servitudes de la normalisation des méthodes d'analyse chimique. *Chim. anal.*, **50**, 267-279.

SEMICHON L., FLANZY M., 1929-1930. Dosage de l'alcool dans les vins et spiritueux par l'emploi du mélange sulfochromique. *Ann. Falsif. Fraudes*, **22**, 139 et 414 ; **23**, 247.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (4), 375-382.

NOTE DE LABORATOIRE

ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ DES COLONNES SCOT POUR L'ANALYSE DES VAPEURS EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

G. BRULÉ et P. DUBOIS

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches de Dijon
Institut national de la Recherche agronomique

Mettant à profit la grande sensibilité des détecteurs à ionisation, BAILEY *et al.* (1961), MACKAY *et al.* (1961), BUTTERY et TERANISHI (1961) et WEURMAN (1961) ont presque simultanément proposé l'analyse des vapeurs émises par les fruits et légumes par injection directe de celles-ci dans un appareil de chromatographie en phase gazeuse. Du fait de sa simplicité, cette technique a été très employée, notamment en vue de l'obtention de « profils aromatiques » (BUTTERY et TERANISHI, 1961) ou « aromagrammes » (TERANISHI et BUTTERY, 1962), permettant de contrôler la qualité des denrées alimentaires. Cette technique a également été utilisée en vue de l'analyse qualitative de la fraction la plus volatile de l'arôme qui échappe aux méthodes utilisant l'extraction par un solvant.

Le fait que ce soit le gaz émis par le liquide qui soit injecté a permis d'utiliser des réactifs chimiques pour transformer certains des constituants en composés non volatils. La disparition de ces constituants du gaz entraîne la disparition des pics qui leur correspondent sur les chromatogrammes. A l'aide de réactifs chimiques, présentant une certaine spécificité vis-à-vis de certaines fonctions, on peut identifier bon nombre de composés volatils, connaissant par ailleurs leurs volumes de rétention. Cette technique proposée par BASSETTE *et al.* (1962) a été modifiée et complétée par HOFF et FEIT (1964).

La technique chromatographique proprement dite présentait en 1961 deux caractéristiques :

— malgré la grande sensibilité des détecteurs, la recherche de composés à l'état de traces ne pouvait se faire que par injection d'un volume de vapeur assez important (5 à 10 ml) ;

— les colonnes susceptibles d'admettre un tel volume au niveau de l'injecteur ne pouvaient être qu'à fort débit gazeux. Il s'agissait donc de colonnes à remplissages de faibles efficacités.

On retrouve ici l'antagonisme entre sensibilité et pouvoir de résolution (ou spécificité) qui est le fait de toutes les techniques analytiques. Comme c'est généralement le cas, divers chercheurs ont étudié les modifications devant permettre d'améliorer l'un de ces facteurs sans affecter l'autre de façon importante.

La première amélioration concerne l'enrichissement des vapeurs, donc la sensibilité. La saturation du liquide par un sel, tel que le sulfate de sodium, augmente la tension de vapeur des différents composés volatils (Bassette *et al.*, 1962) sans doute du fait de l'augmentation de leurs coefficients d'activité. Il est également possible de préparer un « concentré d'arôme », soit sous vide (Merritt *et al.*, 1959), soit par entraînement gazeux en circuit fermé (Dubois *et al.*, 1966, *a* et *b*), selon une technique proche de celle proposée par Nawar et Fagerson (1960). Enfin, le piégeage dans la seringue d'injection a été utilisé par Mabbitt (1963).

Trois solutions ont été envisagées pour améliorer les séparations chromatographiques tout en gardant une bonne sensibilité

La première consiste à piéger les composés volatils des vapeurs dans une précolonne refroidie (Self, 1961 et 1963) qui sert à concentrer l'échantillon par élimination des gaz incondensables. Le balayage de ce piège par le gaz vecteur et son réchauffement rapide permet l'utilisation de colonnes capillaires et l'obtention d'efficacités de l'ordre de 60 000 plateaux théoriques (voir également Reymond *et al.*, 1963).

La seconde solution est celle proposée par Merritt (1963). Elle consiste à programmer la température de la colonne de — 60°C à + 20°C, et à identifier les divers composés par spectrométrie de masse (Bazinet et Merritt, 1962) ou en utilisant les constantes de rétention sur différentes phases liquides (Merritt et Walsh, 1962).

Enfin, Teranishi (1964) utilisa des colonnes capillaires de 0,75 mm de diamètre intérieur, de 300 mètres de long et ayant un débit gazeux de 20 ml/minute. Il obtint ainsi des efficacités de 50 à 75 000 plateaux théoriques tout en injectant jusqu'à 5 ml de vapeur.

Nous avons étudié les possibilités d'emploi des colonnes capillaires ouvertes à support imprégné que nous avons tout d'abord utilisées dans les conditions indiquées par le tableau I.

TABLEAU I

Appareil	Perkin-Elmer 880
Colonnes (S. C. O. T.)	Perkin-Elmer
Diamètre intérieur	0,02 pouce — 0,5 mm
Longueur	200 pieds — 61 mètres
Phase liquide	Carbowax 1 540
Composés injectés	Butyrates de méthyle, d'éthyle et de propyle
Gaz vecteur (Azote)	4,7 ml/minute
Vitesse linéaire moyenne du gaz vecteur	30 cm/s.
Température de la colonne	100°C
Détecteur à ionisation de flamme	

Dans de telles conditions, il est possible d'obtenir des efficacités de l'ordre de 15 000 plateaux théoriques en isotherme et en injectant 1 ml de gaz. La sensibilité mesurée pour la butanone est alors de l'ordre de 2 p. 100 de l'échelle (en atténuation minimale) pour une solution aqueuse de ce composé à la concentration de 10^{-8} et après saturation par du sulfate de sodium.

Ces conditions analytiques découlent d'une observation empirique ; lors d'injections de 1 ml de vapeurs, on avait constaté de meilleures efficacités à des débits de gaz vecteur supérieurs

à l'optimum pratique de 2,6 ml/minute. Il était *a priori* possible d'attribuer cette amélioration à une durée d'injection plus faible ou à un meilleur balayage du système d'introduction.

Nous avons donc entrepris une étude concernant d'une part l'emploi d'un diviseur d'entrée d'autre part le débit optimal pour des injections de volumes importants.

Notons que, dans ce qui suit, on ne tiendra compte que du volume réellement injecté dans la colonne, puisque c'est de lui que dépend essentiellement la sensibilité. Ce volume est :

$$V = V_s \times \left(\frac{a}{a + b}\right)$$

V_s étant le volume de gaz dans la seringue d'injection, a et b étant les débits du diviseur d'entrée vers la colonne et vers l'extérieur respectivement.

Les points figuratifs, obtenus à l'aide de trois débits de ce diviseur d'entrée pour un même débit dans la colonne, ont permis de tracer la courbe de la figure 1. Le seul intérêt du diviseur d'entrée est donc de faciliter l'injection de faibles volumes, comme c'est le cas lors d'injections de liquides.

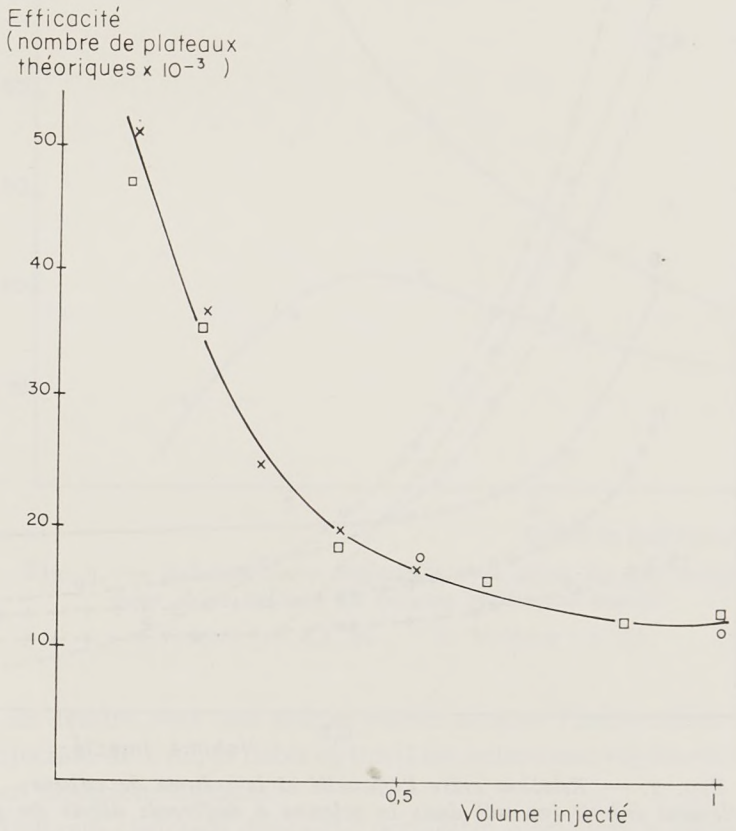


FIG. 1. — *Relation entre l'efficacité et le volume de vapeurs réellement injecté* (en ml) *dans la colonne.* Rôle du diviseur d'entrée. Débit gazeux du diviseur d'entrée : o ml/minute (o), 18 ml/minute (□) et 40 ml/minute (×)

Cette courbe a été reprise sur la figure 2 et y est comparée à celles obtenues à différents débits du gaz vecteur dans la colonne.

Comme le laissaient prévoir les travaux de ETTRE *et al.* (1963), la courbe de Van DEEMTER n'est vérifiée que pour des injections instantanées, c'est-à-dire pour de très faibles volumes, ce qui est en accord avec une étude de GUIOCHON (1963) sur l'influence de la durée d'injection. Au-delà, il existe pour un volume injecté donné, un autre optimum de débit du gaz vecteur ou plus exactement toute une suite d'autres courbes de Van DEEMTER. Les courbes de la figure 2 se

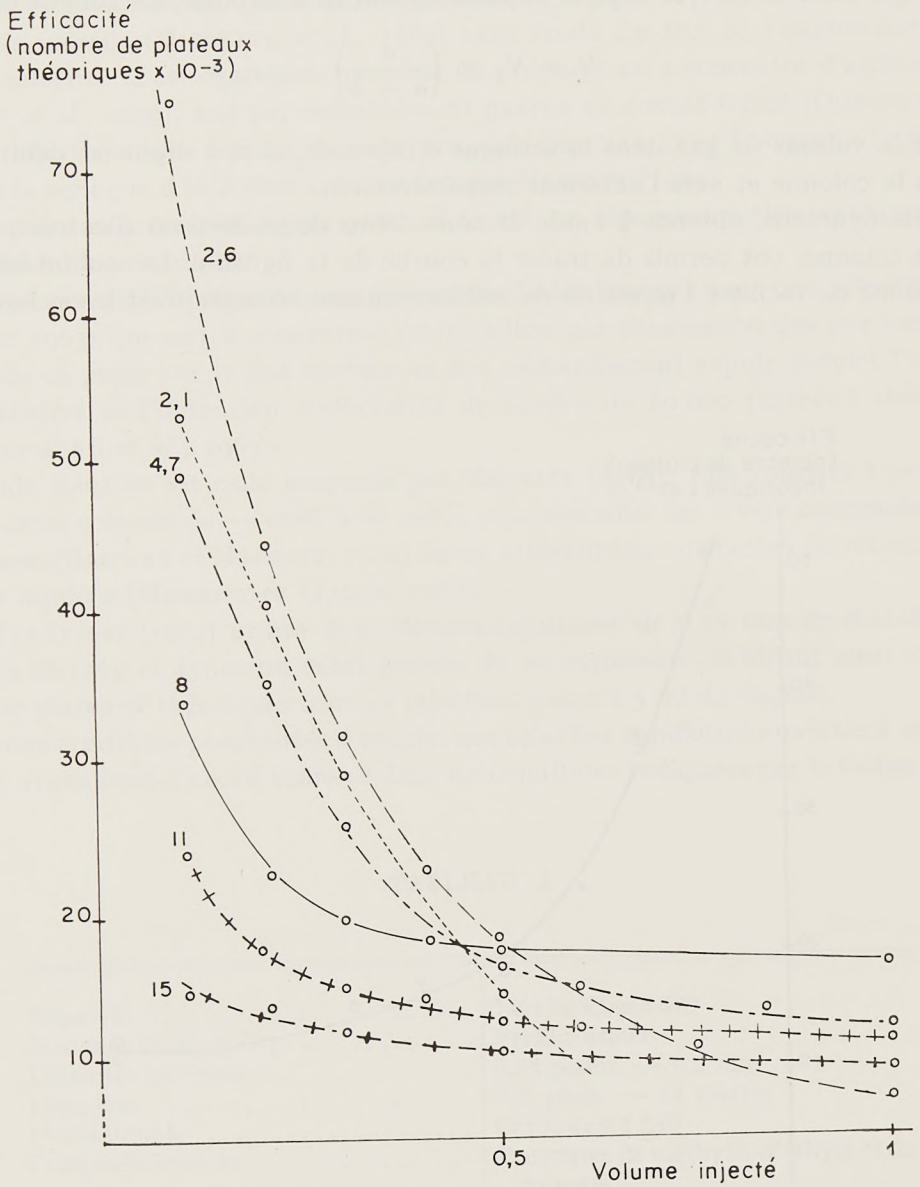


FIG. 2. — *Relation entre l'efficacité et le volume de vapeurs réellement injecté* (en ml) *dans la colonne à différents débits du gaz vecteur*

Débits du gaz vecteur : ml/minute

2,1	.....	8	————
2,6	- - - - -	11	+ + + +
4,7	-.-.-.	15	— + — +

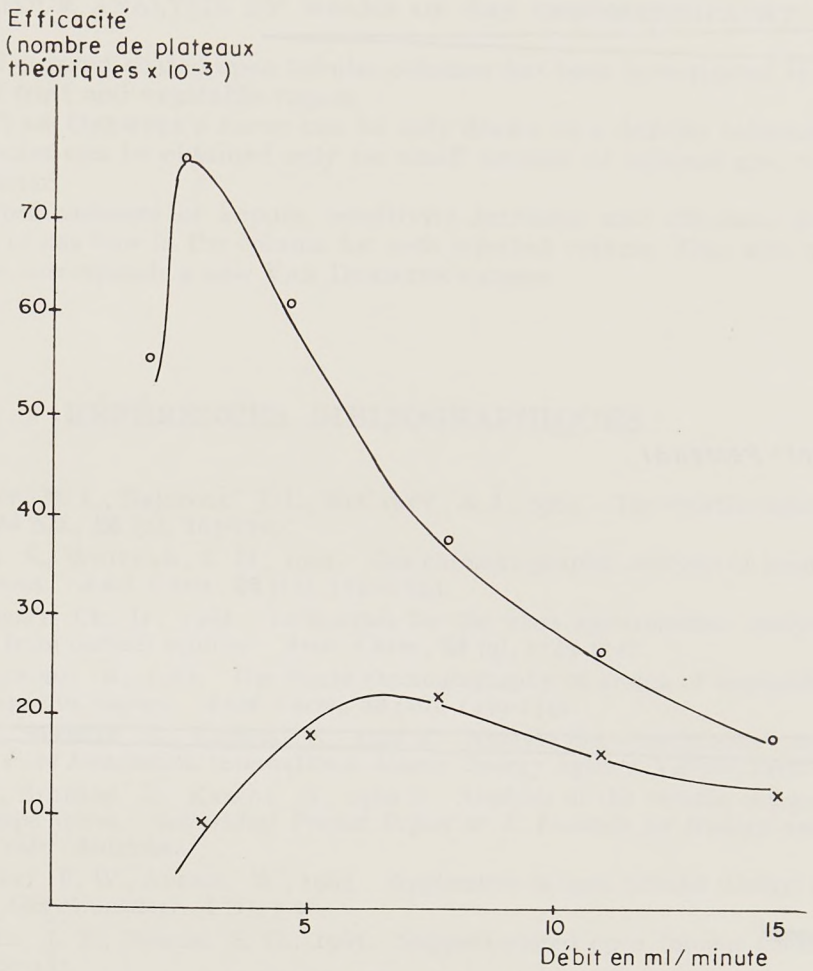


FIG. 3. — *Relation entre l'efficacité et le débit du gaz vecteur pour deux valeurs du volume réellement injecté*

o Volume = 0,1 ml × Volume : 1 ml

recoupent au lieu de tendre vers une même valeur comme l'indiquaient ZLATKIS et WALKER (1963). Pour une injection de 1 ml, le débit optimal est nettement supérieur à celui qu'il est préférable d'employer en injections liquides.

Les résultats indiqués ci-dessus devraient permettre d'orienter le choix des conditions analytiques en fonction des exigences du problème à résoudre. Ils précisent, sous un aspect pratique les dépendances entre les principaux facteurs influant sur l'efficacité et la sensibilité de cette technique.

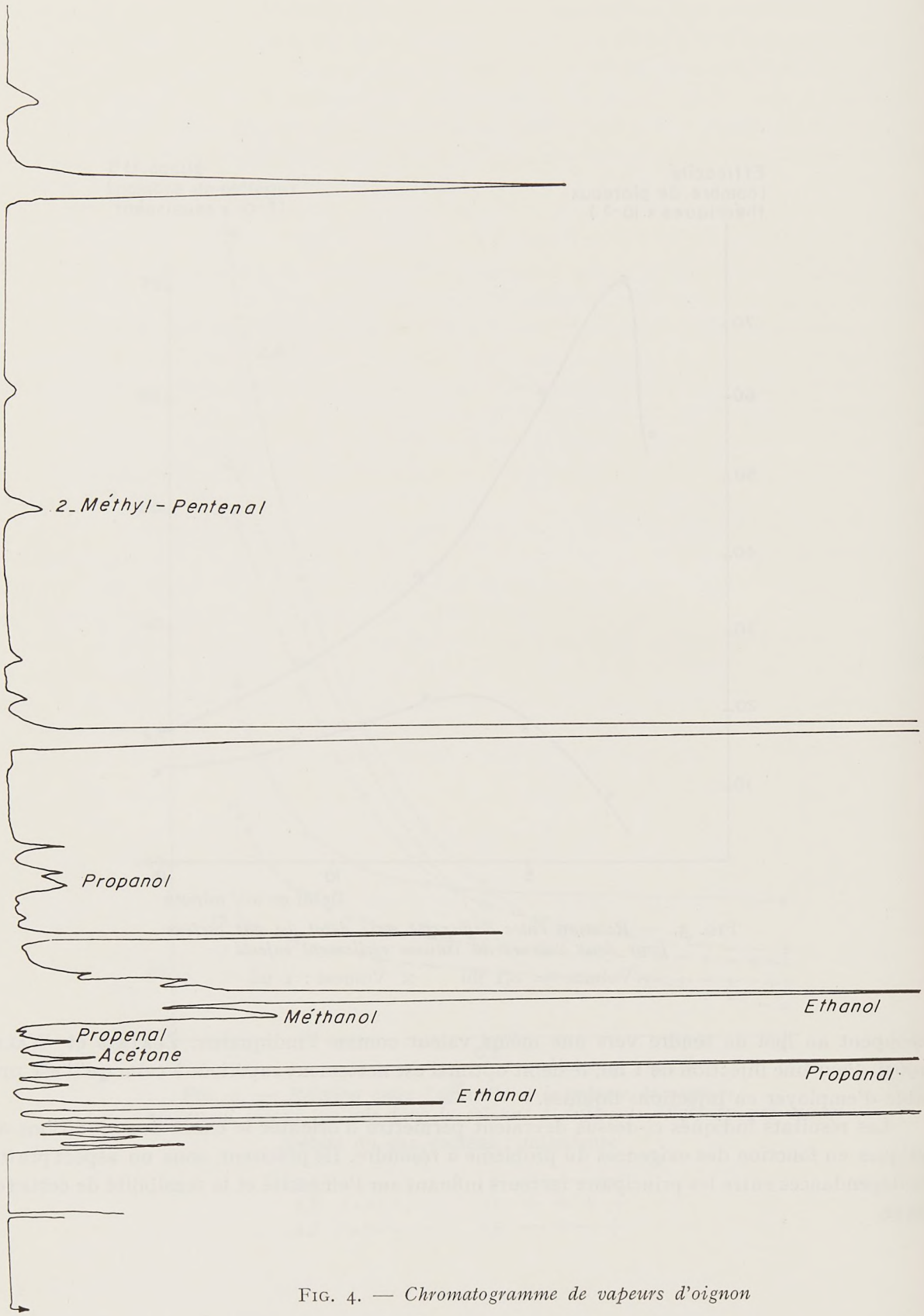


FIG. 4. — *Chromatogramme de vapeurs d'oignon*

La figure 4 est un chromatogramme obtenu par injection de 2 ml de vapeurs de jus d'oignon saturé de sulfate de sodium dans les conditions opératoires indiquées dans le tableau 1, avec des débits respectifs de 4,7 et 40 ml/minute pour la colonne et le by-pass. L'efficacité est de l'ordre de 35 000 plateaux théoriques.

Reçu pour publication en décembre 1969.

SUMMARY

STUDY ON THE EFFICIENCY OF SCOT COLUMN IN VAPOUR ANALYSIS BY MEANS OF GAS CHROMATOGRAPHY

The efficiency of support coated open tubular columns has been investigated in order to use them for analyses of fruit and vegetable vapors.

Data show the VAN DEEMTER's curve can be only drawn at a definite injection volume of vapors. High efficiencies can be obtained only for small amount of injected gas, that is to say with the use of a splitter.

At higher injected volumes of vapors, sensitivity increases and efficiency decreases, but there is an optimum of gas flow in the column for each injected volume. That also means that to each injected volume corresponds a new VAN DEEMTER's curve.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BAILEY S. D., BAZINET M. L., DRISCOLL J. L., MCCARTY A. I., 1961. The volatile sulfur components of cabbage. *J. Food Sci.*, **26** (2), 163-170.

BASSETTE R., OZERIS S., WHITNAH C. H., 1962. Gas chromatographic analysis of head space gas of dilute aqueous solutions. *Anal. Chem.*, **34** (12), 1540-1543.

BAZINET M. L., MERRITT Ch. Jr., 1962. Techniques for the mass spectrometric analysis of volatile compounds isolated from natural sources. *Anal. Chem.*, **34** (9), 1143-1147.

BUTTERY R. G., TERANISHI R., 1961. Gas-liquid chromatography of aroma of vegetables and fruits. Direct injection of aqueous vapors. *Anal. Chem.*, **33** (10), 1439-1441.

DUBOIS P., ZENZ H., STEHLIK G., KAINDL K., 1966 *a*. Analyse des constituants volatils des jus de pommes irradiés. In *Food Irradiation*. International Atomic Energy Agency. Vienna, 1966, 219-229.

DUBOIS P., ZENZ H., STEHLIK G., KAINDL K., 1966 *b*. Analysis of the volatile compounds in irradiated apple and grape juices. *Seibersdorf Project Report n° 8. Institute for Biology and Agriculture Seibersdorf Reactor Center*. Autriche.

ETTRE L. S., CIEPLINSKI E. W., AVERIL W., 1963. Application of open tubular (Golay) columns with larger diameter. *J. Gas chromatogr.*, **1** (2), 7-16.

ETTRE L. S., PURCELL J. E., NOREM S. D., 1965. Support-coated open tubular columns. *J. Gas chromatogr.*, **3** (6), 181-185.

GUIOCHON G., 1963. Influence of injection time on the efficiency of gas chromatography columns. *Anal-Chem.*, **35** (3), 399-400.

HOFF J. E., FEIT E. D., 1964. New technique for functional group analysis in gas chromatography. Syringe reactions. *Anal. Chem.*, **36** (6), 1002-1008.

MABBITT L. A., 1963. A rapid method of preparing samples of milk or cheese odours suitable for gas-chromatographic analysis. In : *Recent Advances in Food Science*, **3**, 185-192. Butterworths, London.

MACKAY D. A. M., LANG D. A., BERDICK M., 1961. Objective measurement of odor. Ionization detection of food volatiles. *Anal. Chem.*, **33** (10), 1369-1374.

MERRITT Ch. Jr., BRESNICK S. R., BAZINET M. L., WALSH J. T., ANGELINI P., 1959. Determination of volatile components of foodstuffs. Techniques and their application to studies of irradiated beef. *J. Agric. Food Chem.*, **7** (11), 784-787.

MERRITT Ch. Jr., WALSH J. T., 1962. Qualitative gas chromatographic analysis by means of retention volume constants. *Anal. Chem.*, **34** (8), 903-907.

MERRITT Ch. Jr., WALSH J. T., 1963. Programmed cryogenic temperature gas chromatography applied to the separation of complex mixtures. *Anal. Chem.*, **35** (1), 110-113.

NAWAR W. W., FAGERSON I. S., 1960. Technique for collection of food volatiles for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, **32** (11), 1534-1535.

PURCELL J. E., ETTRE L. S., 1966. Support-coated open tubular columns. II. Application in trace analysis. *J. Gas chromatogr.*, **4** (1), 23-27.

REYMOND D., CHAVAN F., EGLI R. H., 1963. Gas-chromatographic analysis of the highly volatile constituents of roasted coffee. In : *Recent Advances in Food Science*, **3**, 151-157. Butterworths. London.

SELF R., 1961. An enrichment trap for use with capillary columns. *Nature* (Londres), (4760), 223.

SELF R., 1963. The use of capillary columns gas chromatography for the analysis of odor of cooked potatoes. In : *Recent Advances in Food Science*, **3**, 170-179. Butterworths. London.

TERANISHI R., BUTTERY R. G., 1962. Aromagrams. Direct vapor analysis with gas chromatography. *Féderation internationale des Producteurs de Jus de Fruits*. Symposium de Berne (Suisse) 1962, 257-266.

TERANISHI R., BUTTERY R. G., MON T. R., 1964. Direct vapor analysis with gas chromatography. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **116**, 583-589.

WEURMAN C., 1961. Gas liquid chromatographic studies on the enzymatic formation of volatile compounds in raspberries. *Food Technol.*, **15** (12), 531-536.

ZLATKIS A., WALKER J. Q., 1963. Direct sample introduction for large bore capillary columns in gas chromatography. *J. Gas chromatogr.* **1** (5), 5-11.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (4), 383.

CHRONIQUE DES LIVRES

POINTURIER (H.) et ADDA (J.). — BEURRERIE INDUSTRIELLE. SCIENCE ET TECHNIQUE DE LA FABRICATION DU BEURRE. Paris, Maison rustique, 1969, 456 p.

L'industriel laitier se trouve confronté avec les problèmes que posent chaque jour la technologie nouvelle de production du beurre et le traitement de la matière grasse : culture des levains lactiques, barattage continu ou discontinu, mise au point et conditionnement de produits aussi variés que la crème congelée, huile de beurre, la poudre de crème ou de beurre.

Il n'existait pas jusqu'à ce jour un ouvrage moderne en langue française donnant dans une forme claire et précise, avec une édition soignée, une synthèse de tous les aspects de la beurrerie industrielle.

Le présent ouvrage est le fruit d'une longue collaboration entre un spécialiste d'une grande entreprise laitière et un chercheur scientifique. A côté d'informations technologiques d'avant-garde, il offre des bases solides sur la biochimie des lipides et la bactériologie des produits laitiers.

En plus des divers défauts de fabrication, des formes actuelles de conditionnement, les auteurs ont cherché aussi à développer les diverses techniques de conservation de la matière grasse, ainsi que la production de nouveaux produits offrant de nouveaux débouchés commerciaux.

Ce livre est destiné à tous les techniciens, praticiens et ingénieurs qui ont à traiter la matière grasse du lait, à définir le matériel et les méthodes de fabrication, à diriger et à contrôler les ateliers de production. Il s'adresse aussi aux professeurs et étudiants en technique laitière et en industrie alimentaire. D'une façon générale, il sera un auxiliaire précieux pour d'autres spécialistes — techniciens et économistes des questions alimentaires, constructeurs et installateurs de matériel — qui s'intéressent de près à l'industrie du lait.

Un index détaillé, une présentation en caractères plus petits de sujets particuliers et une abondante documentation (venant de tous pays et citée avec précision) permettent au lecteur d'approfondir les questions qui le préoccupent.

La présentation de l'ouvrage est rendue agréable par de nombreuses photographies et schémas qui viennent à l'appui du texte.

Ann. Technol. agric., 1969, **18** (4), 385-387.

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1969

R. Alifax. — Influence de l'insaponifiable sur la stabilité du beurre. Sa protection par l'acide ascorbique 167

S. Aubert, C. Poux. — Extraction des composés phénoliques du raisin.
I. — Technique d'estimation d'une vendange 93
II. — Taux de passage dans les vins 111

P. Bréchot, J. Chauvet, Madeleine Croson, R. Irrmann. — Contribution à l'étude des métabolismes de l'acide malique en vinification 293

C. Divies, P. Dupuy. — Oxydation de l'acétate par *Acetobacter rancens*..... 339

R. Drapron, L. Sclafani. — Méthode de détermination de l'activité lipolytique des produits biologiques solides ou pâteux 5

J. Duclos, P. Dupuy. — Action combinée de l'acide sorbique et de l'irradiation gamma sur la survie de *Saccharomyces cerevisiae* ayant différentes teneurs en ergostérol 351

C. Flanzy, M. Flanzy, P. André, Y. Chambroy. — Fixation à l'obscurité du $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin en anaérobiose. II. — Devenir du ^{14}C au cours de la fermentation intracellulaire 307

M. Flanzy, S. Aubert. — Méthode de distinction rapide de quelques vins rouges de cépages hybrides interspécifiques producteurs directs par emploi du réactif sulfomercurique 17

M. Flanzy, S. Aubert. — Évaluation des composés phénoliques des vins blancs. Étude comparée de quelques vins de *Vitis vinifera* et de cépages hybrides interspécifiques producteurs directs 27

M. Flanzy, S. Aubert, M. Marinov. — Nouvelle technique de dosage des tanins leucoanthocyaniques. Applications 327

B. Jacquet, J. Arnoux, J. Gaillardon. — Qualités organoleptiques de la viande de veau congelée dans la fabrication de produits de charcuterie et de salaison 279

J. Mourgues, J. Maugenet. — Évaluation de la charge polluante des eaux résiduaires des distilleries vinicoles 129

Andrée Ournac. — Influence de l'origine de la thiamine (levure ou milieu) sur la vitesse de la fermentation alcoolique 187

Andrée Ournac. — Influence des constituants de la thiamine, avant et après sulfitation, sur la vitesse de la fermentation alcoolique 199

J.-C. Sapis, P. Ribéreau-Gayon. — Étude dans les vins du tyrosol, du tryptophol, de l'alcool phényléthylique et de la gamma-butyrolactone, produits secondaires de la fermentation alcoolique.
I. — Identifications et méthodes de dosage..... 207
II. — Présence et signification 221

Notes techniques

J. Antonini, J. Adda. — Dosage par chromatographie en couche mince des acides propionique et butyrique dans le Gruyère de Comté et l'Emmental. 139

A. Arnaud, J. Albert, P. Galzy, R. Bru. — Remarques sur le bilan d'oxydation du glucose et de l'acide pyruvique par la levure 231

G. Brulé, P. Dubois. — Étude de l'efficacité des colonnes Scot pour l'analyse des vapeurs en chromatographie en phase gazeuse 375

P. Dubois. — Extraction des composés volatils en solutions hydroalcooliques par démixion avec des sels 241

M. Flanzy, P. Bénard, C. Flanzy, A. Schober. — Détermination du degré alcoolique de vins et de solutions hydroalcooliques à faibles concentrations en éthanol au moyen du mélange sulfochromique 367

J. Maugenet, Marie-Laure Dalmeyda. — Séparation des acides aminés par chromatographie bidimensionnelle en couche mince sur film 237

C. Poux. — Dosage enzymatique de l'acide L (—) malique 359

Mises au point bibliographiques

J. Carles. — Les acides organiques du vin 263

C. Divies. — Synthèse de la lysine chez la levure 143

J. Mourgues, J. Maugenet. — Méthodes d'évaluation et valeurs de la charge polluante des eaux résiduaires des industries alimentaires 45

M. Moutounet. — Biosynthèse des alcools supérieurs des boissons fermentées. 249

Chronique des livres 67, 161, 383

Informations 69

CONTENTS

R. Alifax. — The effect of the unsaponifiable fraction on the stability of butter. Preservation of butter by ascorbic acid 167

S. Aubert, C. Poux. — Extraction of phenolic compounds of grape.
I. — Estimation technique of a vintage 93
II. — Rate of translocation to the wine 111

P. Bréchot, J. Chauvet, Madeleine Croson, R. Irrmann. — Contribution to the study of malic acid metabolisms in vinification : Beaujolais vinifications, observations during seven years (1962-1968) 293

C. Divies, P. Dupuy. — Oxidation of acetate by *Acetobacter rancens* 339

R. Drapron, L. Sclafani. — A method for determining the lipolytic activity of solid or pasty biological products 5

J. Duclos, P. Dupuy. — Combined effects of sorbic acid and gamma-rays on the survival of *Saccharomyces cerevisiae* containing different amounts of ergosterol 351

C. Flanzy, M. Flanzy, P. André, Y. Chambroy. — Fixation of $^{14}CO_2$ in darkness by grapes in anaerobic conditions. II. — Fate of ^{14}C during intercellular fermentation 327

M. Flanzy, S. Aubert. — A quick method of distinguishing some red wines from interspecific direct-producer hybrids by means of a sulpho-mercuric reagent 17

M. Flanzy, S. Aubert. — Evaluation of phenolic compounds in white wines. A comparative study of some wines from *Vitis vinifera* and from interspecific direct-producer hybrids 27

M. Flanzy, S. Aubert, M. Marinov. — A new technique for the quantitative analysis of leucoanthocyanic tannins 367

B. Jacquet, J. Arnoux, J. Gaillardon. — Organoleptic qualities of frozen veal in the processing and curing of meat products 279

J. Mourgues, J. Maugenet. — Estimation of the pollutional index of winery distillery wastes 129

Andrée Ournac. — Effect of the origin of thiamine (yeast or environment) on the speed of alcoholic fermentation 187

Andrée Ournac. — Effect on the constituents of thiamine, before and after sulphitation, on the speed of alcoholic fermentation 199

J.-C. Sapis, P. Ribéreau-Gayon. — Study on the presence in wines of tyrosol, tryptophol, phenylethylic alcohol and gamma-butyrolactone, secondary products of alcoholic fermentation.

I. — Identifications and methods of quantitative analysis 207

II. — Presence and significance 221

Notes.

J. Antonini, J. Adda. — Thin layer chromatography for the detection of propionic and butyric acids in « Comté » and « Emmental » cheeses 139

A. Arnaud, J. Albert, P. Galzy, R. Bru. — Remarques on the oxydation balance of glucose and pyruvic acid by yeast 231

G. Brulé, P. Dubois. — Study of the efficiency of the Scot column in vapour analysis by means of gas chromatography 375

P. Dubois. — Extraction of volatile compounds in hydroalcoholic solutions through demixing by salts 241

M. Flanzy, P. Bénard, C. Flanzy, A. Schober. — Determination of alcohol content in wines and hydroalcoholic solutions with a low concentration in ethanol by means of a sulphochromic mixture 367

J. Maugenet, Marie-Laure Dalmeyda. — Thin layer bidimensional chromatographic separation of amino acids on film 237

C. Poux. — L (—)malate enzymatic estimation 359

Reviews.

J. Carles. — Organic acids of wine 263

C. Divies. — Synthesis of lysine in yeast 143

J. Mourgues, J. Maugenet. — Evaluation methods and value of the pollution rate of town refuse in food industry 45

M. Moutounet. — Biosynthesis of higher alcohols fermented beverages .. 249

Book reviews 67, 161, 383

Information 69

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques. etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviation ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement,* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *Résumé* (moins de 250 mots) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant sous une forme concise tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences; d) *résultats* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion :* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article : g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds, les dons... : h) *Références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet.* Les figures graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de : et *al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodical,* ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera, en plus, le nom de l'auteur du chapitre cité, les noms des rédacteurs principaux, précédés de la mention « in ».

La mention de « communication personnelle » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit.

Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée, et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des Annales est 16 × 24 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffre arabe visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : Les auteurs recevront une épreuvre pour correction.

Envoi du manuscrit : M. Flanzy, Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne, France, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, 78 - Jouy-en-Josas. On demande deux exemplaires.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 377-1970

Dépôt légal: 1er trimestre 1970. N° d'impression: 377.